

Vergleichende Untersuchungen über die
Wirkung von Nucleosiden,
Steroiden und Nucleosid-Steroid-Gemischen
auf alternde Erythrocyten

von

RENÉ WIK

Frankfurt am Main 1963

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff

Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von
Nucleosiden, Steroiden
und Nucleosid-Steroid-Gemischen
auf alternde Erythrocyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johann-Wolfgang-Goethe Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

René Wik
aus Trautenau in Böhmen

Frankfurt am Main 1963



Dekan: Prof. Dr. med. W. Krücke
Referent: Prof. Dr. med. H. Fischer
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. A. Wacker
Mündliche Prüfung: 20. April 1963

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
A <u>Einleitung und Literaturhinweise.</u>	1
B <u>Methoden.</u>	7
I. Hämolysehemmungsversuche mit verschiedenen Steroiden.	7
II. Konservierungsversuche mit Zusatz von Nucleosiden und Steroiden.	10
1) Bestimmung des ATP-Gehalts der Erythrocyten	10
2) Messung des Hämoglobins im Überstand	13
3) Versuchsansätze	14
C <u>Ergebnisse.</u>	18
I. Hämolysehemmungsversuche mit verschiedenen Steroiden.	18
II. Konservierungsversuche mit Zusatz von Nucleosiden und Steroiden.	28
D <u>Diskussion.</u>	43
E <u>Zusammenfassung.</u>	57
F <u>Literaturverzeichnis.</u>	59

A) Einleitung und Literaturhinweise:

Im Jahre 1665 übertrug L o w e r zum ersten Male Blut von einem lebenden Tier auf ein anderes, und wenig später transfundierte er erstmalig das Blut eines Lammes auf einen Menschen (29). Doch erst rund 250 Jahre danach, als 1900 L a n d s t e i n e r die Blutgruppen des ABO-Systems entdeckte (24), erlangte die Bluttransfusion wirkliche Bedeutung, weil damit die bis dahin unerklärlichen, häufigen Transfusionszwischenfälle zu vermeiden waren. Allerdings war eine Blutübertragung auch damals noch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, denn nicht toxische Anticoagulantien waren noch unbekannt, und man war gezwungen, das Blut direkt vom Spender auf den Empfänger zu übertragen (54).

R o u s und T u r n e r (45) verdanken wir die bedeutsame Erkenntnis, daß man Blut bei Zusatz von Glucose und Citrat etwa zwei Wochen lagern kann, und R o b e r t s o n , ein amerikanischer Militärarzt, wandte erstmalig mit Erfolg die von R o u s und T u r n e r angegebene Methode an und übertrug während des ersten Weltkrieges in 22 Fällen solcherart konserviertes Blut (44). Damit aber hatte eine Behandlungsmethode in die Medizin Einzug gehalten, die bis heute ständig an Bedeutung zugenommen hat, und die schließlich zur Errichtung der Blutbanken führte.

Mit der Erkenntnis, daß sich Blut konservieren läßt, ergab sich aber auch gleichzeitig das Problem, wie man die Blutkonserven möglichst lange lagern könne, ohne daß es zu einer Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Erythrocyten kommt. Die heute gebräuchlichste Methode ist, das Blut in einem Citratpuffer-Dextrosegemisch (ACD) bei einer Temperatur von etwa 5°C zu lagern (3;54), wobei nach rund drei Wochen die Grenze der Lebensfähigkeit erreicht ist (3;19). Transfundiert man Blut nach einer Lagerungszeit von etwa drei Wochen, so

finden sich im Empfängerblut noch 70% überlebende Erythrocyten des Konservenblutes (19;54). Bewahrt man die Konserven noch länger auf, so kommt es in zunehmendem Maße zu einer Schädigung der Erythrocyten, und bereits nach einer sechs Wochen währenden Lagerung überleben nur noch 15% der roten Blutkörperchen nach Transfusion, die übrigen werden innerhalb 24 Stunden abgebaut (17;19).

Will man bei der Erythrocytenkonservierung diesen "Lagerungsschaden", der durch mannigfaltige Veränderungen im Zellstoffwechsel gekennzeichnet ist (3;14;15;19;21;26;27;34;40;47;54;61), vermeiden oder doch zumindest verringern, so kann man dabei verschiedene Wege beschreiten.

I. Bei tiefen Temperaturen werden alle Stoffwechselprozesse gebremst. Es besteht somit die Möglichkeit, die Temperatur bei der Lagerung der Erythrocyten möglichst niedrig zu halten.

II. Man kann versuchen, durch Zusätze zur Konservierungsflüssigkeit die Stoffwechselprozesse der Zelle in einem günstigen Sinne zu beeinflussen.

ad I. Bereits R o u s und T u r n e r erkannten, daß eine Lagerung bei einer dem Gefrierpunkt angenäherten Temperatur die Lebensfähigkeit der konservierten Erythrocyten verlängert. In neuerer Zeit versuchten jedoch englische Forscher (4;31;53;55) die Erythrocyten unter Zusatz von Glycerin einzufrieren. Es gelang ihnen dadurch die Gefrierhämolyse zu verhindern und die Erythrocyten bis zu 21 Monaten bei einer Temperatur von -79°C zu lagern, ohne daß deren Lebensfähigkeit beeinträchtigt wurde.

ad II. L ö h r und W a l l e r weisen darauf hin, daß ein Zusatz von SH-Gruppen schützenden

Substanzen (beispielsweise Cystein) eine günstige Wirkung auf konservierte Erythrocyten haben könnte (27).

Auf Grund früherer Arbeiten von D i - s c h e (6) gelang es P r a n k e r d und A l t m a n nachzuweisen, daß auch in Abwesenheit von Glucose anorganisches Phosphat aus dem Plasma verschwindet und in organische Phosphatester eingebaut wird, wenn man der Konserve Adenosin oder Guanosin zusetzt (39;40). Gleichzeitig stellten sie fest, daß auch in Gegenwart eines Überschusses an Glucose organisches Phosphat bereits nach sechzehnständiger Inkubation bei 37°C in erheblichem Maße abgebaut wird, daß man diesen Abbau aber durch Zusatz von Adenosin oder Guanosin verhindern kann (39).

Weitere Untersuchungen P r a n k e r d s ergaben (40), daß die Erythrocyten adenosinhaltiger Konserven, die bei 4°C gelagert wurden, noch nach einer mehr als dreiwöchigen Lagerung wesentlich mehr 2,3-DPGS und wesentlich weniger anorganisches Phosphat enthalten als die im gewöhnlichen ACD-Medium suspendierten Erythrocyten der Kontrollkonserven.

G a b r i o und Mitarbeiter kamen unabhängig von den eben genannten Autoren zu ähnlichen Ergebnissen. So zeigten G a b r i o , H e n n e s e y , T h o m a s s o n und F i n c h (18), sowie G a b r i o , D o - n o h u e und F i n c h (17), daß es bei Zusatz von Adenosin zu drei Wochen alten Blutkonserven und anschließender, einstündiger Inkubation derselben bei 37°C zu einem Anstieg des intrazellulären organischen Phosphats und des intrazellulären K^+ kommt und daß gleich-

zeitig die osmotische Resistenz der roten Blutkörperchen sowie ihre Überlebenszeit nach Transfusion erhöht wird. Ebenso wie P r a n - k e r d (40) berichten sie (17), daß dadurch außerdem die Fähigkeit der Erythrocyten, Glucose zu verwerten, gesteigert wird.

In einer späteren Arbeit teilen G a - b r i o , F i n c h und H u e n n e k e n s mit, daß man den Konserven statt Adenosin auch Inosin zusetzen kann (19). Diese Beobachtung konnte von R u b i n s t e i n , K a s h - k e t und D e n s t e d t bestätigt werden (47;48).

Ausgehend von diesen Ergebnissen erprobten N a k a o , N a k a o , T a t i b a n a , Y o s h i k a w a und A b e die Wirkung einer Kombination von Inosin und Adenin auf gealterte Erythrocyten (32). Sie fanden bei acht Wochen alten Erythrocyten nach dreistündiger Inkubation bei 37°C unter Zusatz von Inosin allein einen Anstieg vor allem der 2,3-DPGs, weniger der ATP. Setzte man der Konserve jedoch Inosin u n d A d e n i n zu, so stieg der ATP-Spiegel auf 70% des Wertes frischer Erythrocyten an. Gleichzeitig zeigten die Erythrocyten einen Gestaltwandel, indem sie sich von einer sphärischen wieder mehr einer Scheibenform näherten. Zu ähnlichen Resultaten gelangten W o s e g i e n und F i s c h e r , die ebenfalls die Überlegenheit eines kombinierten Inosin-Adeninzusatzes gegenüber dem alleinigen Zusatz von Inosin oder Adenosin beweisen konnten (61).

In einer späteren Arbeit gelang es F i - s c h e r , F e r b e r , F r i t z s c h e , W o s e g i e n und S p i e l m a n n zu

zeigen, daß nicht nur ein Inosin-Adeninzusatz dem Inosin- oder Adenosinzusatz überlegen ist, sondern daß auch eine Kombination Inosin-Adenin-Guanosin die Wirkung der einzeln zugesetzten Nucleoside übertrifft, ja wahrscheinlich sogar noch wirksamer ist als das Inosin-Adenin-Gemisch (14).

In früheren Arbeiten über den Mechanismus der unspezifischen Lyse kam der Arbeitskreis um H. F i s c h e r zu der Vermutung, daß das Komplement-Propertdin-System auch bei der Zellmauserung und damit bei der Lyse gealterter Erythrocyten eine Rolle spielt. F i s c h e r, F r i t z s c h e und A r g e n t o n konnten zeigen, daß die Zellzerfallsprodukte Protamin und Histon, aber auch Leukämikerzellen die unspezifische Hämolyse verstärken und daß sich die Lyse solcherart vorgeschädigter Erythrocyten einmal durch Adenosin und zum andern durch Prednisolon verhindern läßt (12;13).

Darüber hinaus ist heute allgemein bekannt, daß hohe Dosen von Cortison sowohl auf den Verlauf von Leukämien, als auch auf den von hämolytischen Anämien einen günstigen Einfluß ausüben. Es lag daher der Gedanke nahe, zu versuchen, ob man durch Zusatz bestimmter Steroide zu alternden Erythrocyten deren Hämolyse verzögern könnte.

Dieser Versuch erschien doppelt gerechtfertigt, nachdem U l s a m e r nachweisen konnte, daß Prednisolon den Zerfall von Granulocyten und Thrombocyten bei Zimmertemperatur zu verzögern vermag (59).

F i s c h e r, F r i t z s c h e, F e r b e r, W o s e g i e n und S p i e l -

m a n n fanden, daß die Hämolyse in einem 40 Tage alten Erythrocytenkonzentrat bei Prednisolonzusatz geringer ist, als bei unbehandelten Erythrocyten (14), während F e r b e r , G ö h r i n g und F i s c h e r beweisen konnten, daß Prednisolon auch die mechanische Resistenz gealterter roter Blutkörperchen verbessert. Die gleichen Autoren berichten, daß eine Kombination von Inosin-Adenin-Guanosin, - von ihnen "IAG" genannt, - mit Prednisolon die mechanische Resistenz der gealterten Erythrocyten noch weiter verbessert (8).

Diese Ergebnisse führten zu der Fragestellung dieser Arbeit, in der untersucht werden soll,

- 1.) welches Steroid aus einer größeren Anzahl verschiedener Steroide einen günstigen Einfluß auf den Stoffwechsel alternder Erythrocyten ausübt, und ob
- 2.) dieses oder diese Steroide allein oder
- 3.) kombiniert mit
 - a) Inosin
 - b) Inosin + Adenin
 - c) Inosin + Adenin + Guanosindie Alterung der Erythrocyten noch mehr hinauszögert als die Nucleoside allein.

Zunächst wurden dabei elf Steroide auf ihre Fähigkeit geprüft, die Hämolyse alternder Erythrocyten zu verzögern. Danach wurden zwei von diesen sowohl allein, als auch in Kombination mit Nucleosiden alternenden Blutkonserven zugesetzt und optisch-enzymatisch der ATP-Gehalt der Erythrocyten sowie ihr Hämolysegrad in regelmäßigen Zeitabständen bestimmt.

B) Methoden:

I. Hämolysehemmungsversuche mit verschiedenen Steroiden:

In einem Vorversuch, der dazu diente, die Methode auszuarbeiten, wurden zunächst drei Steroide, nämlich Solu-Decortin-H, 11-epi-Hydrocortison und Cholesterin auf ihre Fähigkeit untersucht, die Hämolyse alternder Erythrocyten zu verzögern.

Die Steroidkonzentration der zu untersuchenden Blutproben sollte bei jedem Steroid, berechnet auf 2 ml Blut,

- a) 1,0 millimolar
- b) 0,5 millimolar
- c) 0,1 millimolar
- d) 0,05 millimolar
- e) 0,01 millimolar

sein.

Von jedem Steroid wurden drei Reihen angesetzt und der Hämolysegrad einer jeden Reihe im Abstand von rund drei Tagen, beginnend etwa am 10. Tag der Alterung, bestimmt.

Es wurde eine 5 millimolare Lösung hergestellt (Lösung A) und diese einmal 1:10 (Lösung B) und einmal 1:100 (Lösung C) verdünnt. Als Lösungsmittel diente 96%iger Alkohol.

Von der Lösung A wurden jeweils 0,4 ml und 0,2 ml, von Lösung B 0,4 ml und 0,2 ml und von Lösung C 0,4 ml in sterile Röhrchen einpipetiert. In jedes Kontrollröhrchen kam 0,4 ml Lösungsmittel ohne irgendeinen Zusatz.

Die so beschickten Röhrchen wurden danach mit einem sterilen Tuch abgedeckt und das Lösungsmittel über Nacht im Trockenschrank bei 65°C verdampft, sodaß ein feiner Film des zugesetzten Steroids zurückblieb.

Am nächsten Morgen wurden einer frischen Voll-

blutkonserve von 500 ml Inhalt 1200000 I.E. Penicillin zugesetzt, um ein eventuelles Bakterienwachstum zu verhindern, sodann der Inhalt der Konserve durch sterilen Mull koliert und jedes Röhrchen mit 2 ml Blut beschickt. Danach wurden die Röhrchen mit sterilen Stopfen verschlossen, einmal geschüttelt und bei 25°C im Brutschrank gelagert.

Um eine ungleichmäßige Verteilung des austretenden Hämoglobins zu vermeiden, wurde der Inhalt jedes Röhrchens täglich durch behutsames Kippen durchgemischt.

Von den Blutproben der ersten Reihe wurde der Hämolysegrad etwa am 10. Tag, von denen der zweiten Reihe drei bis vier Tage später und von denen der dritten Reihe wiederum drei bis vier Tage später gemessen. Zu diesem Zwecke wurden die festen Bestandteile in jedem Röhrchen 2 Minuten lang bei 500 U/min abzentrifugiert, der hämolytische Plasmaüberstand vorsichtig abgehebert und seine Extinktion im Photometer gemessen. (Photometer Eppendorf, Mikroküvette, 10 mm Schichtdicke, Filter 546 nm mit Vorsatzblende.)

Um die Möglichkeit einer bakteriellen Verunreinigung der Röhrchen und damit die Möglichkeit einer bakteriell bedingten Hämolyse auszuschließen, wurde von jedem Röhrcheninhalt am Tage der Messung eine Sterilitätskontrolle durchgeführt. Die hierfür verwendeten Bouillon-Agar Nährböden wurden von der Blutbank bezogen.

Zum besseren Verständnis des Versuchsansatzes sei an Hand eines Steroids die Beschickung der Röhrchen dargestellt.

Substanz I (Cortisonacetat)

- a) Konz.: 1,0 millimol., Lösg.A 0,4 ml einpipetieren
- b) Konz.: 0,5 millimol., Lösg.A 0,2 ml einpipetieren
- c) Konz.: 0,1 millimol., Lösg.B 0,4 ml einpipetieren
- d) Konz.: 0,05 millimol., Lösg.B 0,2 ml einpipetieren
- e) Konz.: 0,01 millimol., Lösg.C 0,4 ml einpipetieren

- Reihe 1: a; b; c; d; e; (Messung am 10. Tag)
 Reihe 2: a; b; c; d; e; (Messung am 13. Tag)
 Reihe 3: a; b; c; d; e; (Messung am 16. Tag)

In späteren Versuchen wurde die Anzahl der zu untersuchenden Steroide vermehrt, und zwar wurden untersucht:

- I. Cortisonacetat = Δ^4 -Pregnendiol-(17 α ,21)-trion-(3,11,20)-21-essigsäureester
- II. Solu-Decortin-H = $\Delta^{1,4}$ -Pregnadien-11 β ,17 α ,21)-dion-(3,20)-succinat-Natrium
- III. Methyltestosteron = 17 Methyl- Δ^4 -Androstenol-(17 β) -on-(3)
- IV. Fortecortin = $\Delta^{1,4}$ -Pregnadien-9-fluor-16-methyl-triol-(11 β ,17 α ,21)-dion-(3,20)-21-N-diäthylamino-essigsäureester-hydrochlorid
- V. 11-epi-Hydrocortison = Δ^4 -Pregnen-11 α ,17 α ,21)-dion-(3,20)
- VI. Presuren = Na-Salz des 21-Hydroxy-Pregnandion-(3,20)-21-hemisuccinats
- VII. Östradiol = $\Delta^{1,3,5(10)}$ -Oestratriendiol-(3,17 β)
- VIII. Testosteron = Δ^4 -Androstenol-(17 β) -on-(3)
- IX. 11-Desoxycorticosteron = Δ^4 -Pregnenol-(21)-dion-(3,20)
- X. Ergosterin = 24-Methyl- $\Delta^{5,7,22}$ -Cholestan-trienol-(3 β)

XI. Cholesterin = Δ^5 -Cholestenol-(3 β)

Ansatz und Durchführung des Versuchs blieben dabei unverändert.

II. Konservierungsversuche mit Zusatz von Nucleosiden und Steroiden:

1. Bestimmung des ATP-Gehalts der Erythrocyten:

a) Aufbereitung der Extrakte:

Um eine Hydrolyse der labilen ATP zu vermeiden, wurden die Erythrocyten bei möglichst tiefen Temperaturen, also im Eisbad und in der Kühlzentrifuge aufbereitet.

Blut wurde 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, das Plasma abgehebert und verworfen. Aus 1 ml Erythrocytensediment und 1,2 ml physiol. NaCl wurde eine Suspension hergestellt und zum Enteiweißen 2,25 ml 6%ige Perchlorsäure zugesetzt, das Gemisch mit einem Glasstab gut durchgemischt und anschließend 20 Minuten lang bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehebert und neutralisiert, indem tropfenweise 5%ige KOH zugegeben wurde. Dabei fiel unlösliches Kaliumperchlorat aus. Der Extrakt wurde nun 15 Minuten stehen gelassen, um einen möglichst vollständigen Ausfall des $KClO_4$ zu erreichen, und danach nochmals 15 Minuten lang bei 4000 U/min zentrifugiert. Nach erneutem Abhebern des Extraktes vom $KClO_4$ -Niederschlag wurde der ATP-Gehalt des Extraktes photometrisch bestimmt.

b) Optisch-enzymatische Bestimmung der ATP

Die photometrische Bestimmung des ATP-Gehalts der Extrakte erfolgte nach der von der Firma B o e h r i n g e r (62) angegebenen Arbeitsanleitung, die geringfügig modifiziert wurde.

Die für die optisch-enzymatische ATP-Bestimmung benötigten Reagentien wurden ebenfalls in fertigen Packungen von der Firma Boehringer bezogen.

Bei der enzymatischen Bestimmung der ATP laufen im Prinzip folgende Reaktionen ab: (Zitat aus der Arbeitsanleitung von B o e h r i n g e r .)

" Das Enzym Phosphoglyceratkinase (PGK) katalysiert die Reaktion



Bestimmt man mit Hilfe der durch GAPDH katalysierten 'Indikatorreaktion'



die gemäß Gleichung 1 aus 3-PGS und ATP gebildete Menge an 1,3-PGS-P, so ist der DPN-H-Verbrauch ein Maß für die vorliegende ATP-Menge und Meßgröße.

Die Gleichgewichte der gekoppelten Reaktionen 1 und 2 werden durch Abfangen des GAP mittels Cystein ganz auf die Seite von GAP, Ph und DPN^+ verschoben, so daß stöchiometrischer Umsatz erfolgt.

Die Gesamtgleichung heißt



Abkürzungen:

3-PGS = d(-)-3-Phosphoglycerinsäure

1,3-PGS-P = d-1,3-Diphosphoglycerinsäure

GAP = d(+)-Glycerinaldehydphosphorsäure

Ph = anorganisches Phosphat

Reagentien für die photometrische Bestimmung:

I) Reaktionsgemisch: (TRA/PGS)

0,10 m Triäthanolaminpuffer pH 7,6;

4×10^{-3} m MgSO_4 ; 3×10^{-3} m Cystein;

6×10^{-3} m 3-PGS

II) Reduziertes DPNH

$1,2 \times 10^{-2}$ m DPN-H+H^+

III) GAPDH/PGK

4 mg/ml GAPDH; 1 mg/ml PGK

Bestimmungsansatz: (Nach Arbeitsanleitung der Firma Boehringer, modifiziert nach Wosegien und Fischer)

In eine 10 mm Küvette des Photometers Eppendorf werden einpipetiert

1.) 1,5 ml TRA/PGS

2.) 0,04 ml DPN-H

3.) 0,5 ml Extrakt

Der Küvetteninhalt wird gut durchgemischt und die Extinktion gegen einen Leerwert ohne DPN-H-Zusatz abgelesen. Danach werden

4.) 0,02 ml GAPDH/PGK

zugefügt, gemischt, und die Extinktion nach jeder Minute über insgesamt fünf Minuten abgelesen.

Die Küvette wird beheizt (25°C). Filter 366 nm

Durch Extrapolieren wird danach die Extinktionsdifferenz, ΔE , ermittelt.

c) Berechnung:

ΔE 0,100 entspricht 0,0303 $\mu\text{Mol ATP} / \text{ml}$;

umgerechnet auf 2,06 ml Küvetteninhalt =

$0,0303 \mu\text{Mol} \times 2,06 = 0,0624 \mu\text{Mol ATP} / \text{Küvette}$

oder 31,64 $\gamma\text{ATP} / \text{Küvette}$.

Um die Anfangsverdünnung von 1:1 (2,25 ml Erythrocyten-suspension + 2,25 ml Perchlorsäure) zu berücksichtigen, muß der gefundene Wert mit 2 multipliziert werden.

Also: $31,64 \times 2 = 63,28$

das heißt ΔE 0,100 entspricht 63,28 γATP

Da in einem Küvettenansatz 0,5 ml Extrakt verwandt wurden, der ATP-Gehalt der Extrakte in den graphischen Darstellungen jedoch in mg% ausgedrückt wurde, ist der erhaltene Wert noch auf mg% umzurechnen, das heißt, der erhaltene Wert muß noch mit 2×100 multipliziert und durch 1000 dividiert werden.

Also: ΔE 0,100 entspricht $\frac{63,28 \times 2 \times 100}{1000}$

oder 12,656 mg% ATP

2. Messung des Hämoglobins im Überstand:

Das ins Plasma ausgetretene Hämoglobin (Hb) wurde nach einer von B e t k e und S a v e l s b e r g (1) beschriebenen Methode in Cyanhämglobin überführt, welches ein Absorptionsmaximum bei 540 nm besitzt.

Da mit dieser Methode normalerweise der Hb-Gehalt von Vollblut bestimmt wird, der Hb-Gehalt des Plasmaüberstandes jedoch wesentlich geringer ist, wurde der Ansatz modifiziert und statt 0,02 ml Blut die zehnfache Menge des Überstands, also 0,20 ml verwandt.

Es wurde ein Reagenzglas mit 4,8 ml Transformationslösung beschickt, 0,20 ml hämolytischer Plasmaüberstand hinzugefügt, der Inhalt des Röhrchens gemischt und 10 Minuten stehen gelassen, um das Hämoglobin vollständig in Cyanhämglobin überzuführen. Danach wurde der Inhalt des Röhrchens in eine Küvette von 1 cm Schichtdicke überführt und die Extinktion im Photometer Eppendorf bei 546 nm gegen einen Leerwert reiner Transformationslösung gemessen.

Die Transformationslösung hat folgende Zusammensetzung:

Kaliumferricyanid	200 mg
Kaliumcyanid	50 mg
Natriumbicarbonat	1000 mg

werden in Aqua dest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. In brauner Flasche aufbewahrt ist die Lösung mehrere Wochen haltbar.

An dieser Stelle muß allerdings auf einen Nachteil der Hämoglobinbestimmung mittels der Cyanhämglobinmethode nach B e t k e und S a v e l s b e r g hingewiesen werden. Diese Methode dient eigentlich der Bestimmung des Hämoglobingehalts des Vollbluts, während

in diesem Falle der Hämolysegrad, das heißt der Hämoglobingehalt des Plasmas gemessen wurde. Nachuntersuchungen F r i t z s c h e s (16) führten zu dem Ergebnis, daß die ins Plasma ausgetretenen Hämoglobinemengen zu gering sind, um genaue Meßwerte zu ergeben, sodaß die Methode zwar für die Messung des Hb-Gehalts von Vollblut geeignet ist, nicht aber zur genauen Bestimmung des Hämolysegrades. Dennoch reichen die erhaltenen Werte aus, um die Wirksamkeit der einzelnen Zusätze vergleichen zu können, weswegen die Ergebnisse auch in diese Arbeit aufgenommen wurden.

3. Versuchsansätze:

Versuch Nr.1

Eine frische Blutkonserve mit 500 ml Inhalt wurde in 5 Portionen zu je 100 ml geteilt. Danach wurden den einzelnen Portionen zugesetzt:

- a) Physiol. NaCl
- b) 5 μ Mol/ml Inosin
- c) 5 μ Mol/ml Inosin + 0,25 μ Mol/ml Adenin
- d) 5 μ Mol/ml Inosin + 0,25 μ Mol/ml Adenin
+ 0,25 μ Mol/ml Guanosin
- e) 0,1 μ Mol/ml Solu-Decortin-H

Die Konserven wurden sodann mit physiologischer NaCl auf ein einheitliches Gesamtvolumen von 110 ml / Konserve aufgefüllt. Die Konzentrationen der Zusätze waren auf dieses Gesamtvolumen von 110 ml berechnet. Vom Rest der geteilten 500 ml-Konserve wurden sofort ATP-Gehalt und der Hämolysegrad des Blutes bestimmt.

Im Abstand von jeweils 10 Tagen wurden jeder Teilkonserve Proben entnommen und von jeder Probe die Hälfte sofort, die andere Hälfte nach einstündiger Inkubation bei 37°C auf ihren Gehalt an ATP untersucht. Gleichzeitig wurde der Hämolysegrad der entnommenen Blutproben gemessen.

Versuch Nr.2:

Eine frische Blutkonserve mit 500 ml Inhalt wurde in sechs gleiche Teile geteilt und mit folgenden Zusätzen beschickt:

- a) Physiologische NaCl
- b) Solu-Decortin-H (0,25 μ Mol/ml)
- c) 11-epi-Hydrocortison (0,25 μ Mol/ml)
- d) Inosin (20 μ Mol/ml)
- e) Solu-Decortin-H + Inosin
- f) 11-epi-Hydrocortison + Inosin

Die Konzentrationen waren berechnet auf ein einheitliches Gesamtvolumen von 90 ml, auf das jede Teilkonserve mit physiol. NaCl aufgefüllt worden war. Bei den Ansätzen e und f waren die Inosin- und Steroidkonzentrationen die selben wie bei den entsprechenden Zusätzen der Ansätze b, c und d.

Im Abstand von je zehn Tagen wurden in sämtlichen Teilkonserven der ATP-Gehalt sowie der Hämolysegrad bestimmt.

Außerdem wurde von der frischen Konserve, vor ihrer Aufteilung in Teilkonserven eine Probe entnommen und zur Sofortbestimmung von ATP-Gehalt und Hämolysegrad verwandt.

Versuch Nr.3:

Ansätze und Durchführung dieses Versuches entsprechen ganz der Durchführung und den Ansätzen des Versuchs Nr.2. Die einzige Abänderung besteht darin, daß jeweils statt des Inosinzusatzes ein Gemisch von Inosin (20 μ Mol/ml) + Adenin (0,5 μ Mol/ml) + Guanosin (0,5 μ Mol/ml) zugesetzt wurde. Dieses Inosin + Adenin + Guanosin - Gemisch wird im folgenden IAG genannt.

Die Ansätze des Versuchs Nr.3 waren also folgende:

- a) Physiologische NaCl
- b) IAG

- c) Solu-Decortin-H
- d) 11-epi-Hydrocortison
- e) Solu-Decortin-H + IAG
- f) 11-epi-Hydrocortison + IAG

Versuch Nr.4:

Eine frische Blutkonserve mit 500 ml Inhalt wurde in vier gleiche Teile geteilt und mit folgenden Zusätzen beschickt:

- a) Physiologische NaCl
- b) IAG
- c) Solu-Decortin-H
- d) 11-epi-Hydrocortison

Sodann wurden die einzelnen Teilkonserven auf ein Gesamtvolumen von je 150 ml mit physiol. NaCl aufgefüllt.

Nach einer Lagerungszeit von 20 Tagen bei 4°C wurden die Teilkonserven nochmals in je zwei gleiche Halbkonserven aufgeteilt, von denen jeweils die eine nochmals einen Zusatz von IAG erhielt und dann auf 90 ml mit physiol. NaCl aufgefüllt wurde, während die andere nur mit physiol. NaCl auf 90 ml Endvolumen aufgefüllt wurde.

Von der frischen 500 ml-Konserve, sowie den 150 ml-Teilkonserven unmittelbar vor ihrer Teilung in Halbkonserven, wurde der ATP-Gehalt und der Hämolysegrad bestimmt. Von den 90 ml-Halbkonserven wurde erstmalig zehn Tage nach Teilung der 150 ml-Konserven und dann immer im Abstand von zehn Tagen der ATP-Gehalt und der Hämolysegrad bestimmt.

Die Zusätze wurden in folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

Inosin:	20 μ Mol/ml
Adenin:	0,5 μ Mol/ml
Guanosin:	0,5 μ Mol/ml
Solu-Decortin-H:	0,25 μ Mol/ml
11-epi-Hydrocortison:	0,25 μ Mol/ml

Dabei bezog sich die Konzentration immer auf den ml-Ansatz, das heißt, die zum Auffüllen auf ein einheitliches Endvolumen benötigte NaCl-Menge war in der Konzentrationsberechnung berücksichtigt.

C) Ergebnisse:

I. Hämolysehemmungsversuche mit verschiedenen Steroiden:

Versuch Nr.1

Tafel Nr.1 zeigt die Ergebnisse des Hämolyseversuches bei Zusatz von drei verschiedenen Steroiden. Bei der am 9. Tag durchgeführten Messung des Hämolysegrades der Erythrocyten zeigen sich noch keine signifikanten Unterschiede.

Nach 12 Tage wählender Inkubation bei 25°C läßt sich aber schon eine Wirkung der zugesetzten Steroide feststellen.

Alle drei verwendeten Steroide, Solu-Decortin, 11-epi-Hydrocortison und Cholesterin üben einen Schutzeffekt aus, das Solu-Decortin wirkt am besten in höheren Konzentrationen (1,0 μ Mol/ml) und mit abnehmender Konzentration nimmt auch seine Schutzwirkung ab. 11-epi-Hydrocortison und Cholesterin dagegen entfalten ihre größte Wirksamkeit in niedrigen Konzentrationsbereichen. Insgesamt am besten wirkt ein Zusatz von 1,0 μ Mol/ml Solu-Decortin oder 0,01 μ Mol/ml 11-epi-Hydrocortison.

Versuch Nr.2

Die Tafeln 2 bis 4 zeigen den Versuchsverlauf bei Verwendung der oben genannten elf Steroide.

Nach zehntägiger Lagerung der Erythrocyten ist mit Ausnahme des Presurens noch keine Wirkung zu erkennen; Presuren zeigt in höheren Konzentrationen eine hämolysefördernde Wirkung.

Nach 16 Tagen zeigen alle untersuchten Steroide eine hämolysehemmende Wirkung, wobei, mit Ausnahme des Cholesterins, mit steigender Konzentration auch der hämolysehemmende Effekt deutlicher wird. Am wirksamsten sind 11-Desoxycorticosteron, Methyltestosteron, 11-epi-hydrocortison und Presuren. Dann folgen Solu-Decortin

und Cortisonacetat. Weniger wirksam sind Testosteron, Östradiol und Fortecortin, während Ergosterin und Cholesterin kaum eine Wirkung entfalten.

Nach 18 Tagen bietet sich ein ähnliches Bild wie am 16. Tag. Wiederum weisen, mit einer Ausnahme, die Proben bei höherer Konzentration des Zusatzes eine geringere Hämolyse auf als bei niedriger. Auch jetzt zeigen 11-Desoxycorticosteron und Methyltestosteron die größte Wirksamkeit. Dann folgen Cortisonacetat, Solu-Decortin und 11-epi-Hydrocortison, während Fortecortin, Testosteron und Östradiol nicht so stark wirksam sind. Ergosterin ist fast und Cholesterin völlig unwirksam. Beim Presuren liegt das Maximum der Wirksamkeit bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{Mol/ml}$, höhere und niedrigere Konzentrationen vermögen die Hämolyse nicht so gut zu verzögern.

Versuch Nr.3

Die Tafeln Nr. 5 bis 7 zeigen die Ergebnisse einer Wiederholung des Versuchs Nr.2.

Bei 6 Tage alten Erythrocyten ist ein Steroid-effekt noch nicht zu erkennen.

Am 11. Tag erkennt man nur beim Testosteron, Solu-Decortin und Östradiol einen deutlichen hämolysehemmenden Effekt. Zusatz von Cortisonacetat, Methyltestosteron und Fortecortin bewirkt nur in höherer Konzentration eine Hämolysehemmung. 11-epi-Hydrocortison verhält sich indifferent, während Presuren, 11-Desoxycorticosteron, Ergosterin und Cholesterin, in höheren Konzentrationen zugesetzt, eher hämolysefördernd wirken.

Nach 15 Tagen sind Testosteron, Cortisonacetat, Solu-Decortin, 11-epi-Hydrocortison und Östradiol am besten wirksam. Methyltestosteron zeigt einen deutlichen Effekt bei Konzentrationen von $1,0$ und $0,5 \mu\text{Mol/ml}$; ist die Konzentration niedriger, wirkt es eher hämolysefördernd. 11-Desoxycorticosteron wirkt ähnlich, wenn auch

nicht so deutlich. Presuren, Ergosterin und Cholesterin verhalten sich indifferent.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine eindeutige Hämolysehemmung in wiederholten Versuchen immer mit Cortisonacetat, Solu-Decortin und, bei höherer Dosierung, Methyltestosteron zu erzielen war. 11-epi-Hydrocortison, Testosteron und Östradiol zeigten ebenfalls eine, wenn auch geringere Wirksamkeit, während Cholesterin und Ergosterin unwirksam waren. Die mit 11-Desoxycorticosteron und Presuren erhaltenen Ergebnisse waren uneinheitlich.

Tafel 1
25-Ext.

Hamolysehemmungsversuch Nr 1

II = Solu - Decortin-H

Y = 11-epi-Hydrocortison

XI = Cholesterin

a = 1,0 millimolar

b = 0,5

c = 0,1

d = 0,05

e = 0,01

9. Tag

Die Querstriche geben den höchsten und niedrigsten Meßwert der Kontrollen an.

* Der Meßwert mußte wegen unsterilen Röhrcheninhalts verworfen werden.

Ext.

2,5

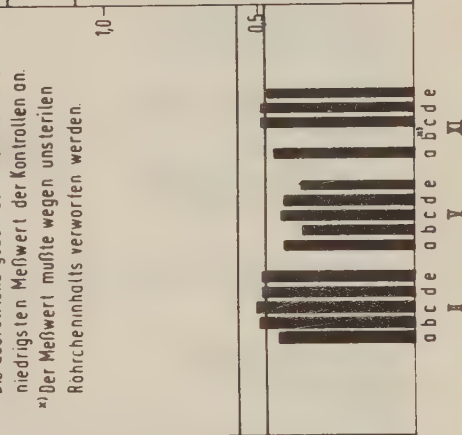
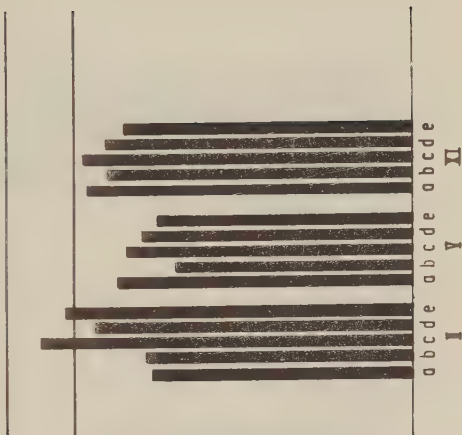
2,0

1,5

1,0

0,5

12. Tag



Tafel 2

Hämolysehemmungsversuch Nr. 2

10. Tag

a = 1,0 millimolar
b = 0,5 "
c = 0,1 "
d = 0,05 "
e = 0,01 "

- I = Cortisonacetat
- II = Solu-Decortin-H
- III = Methyltestosteron
- IV = Fortecortin
- V = 11-epi-Hydrocortison
- VI = Presuren
- VII = Ostradiol
- VIII = Testosteron
- IX = 11-Desoxycorticosteron
- X = Ergosterin
- XI = Cholesterin

Die Querlinien geben den höchsten und niedrigsten Meßwert der Kontrollen an!

Ext.

2,5

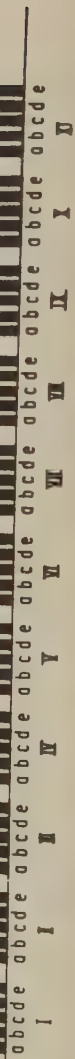
2,0

1,5

1,0

0,5

0

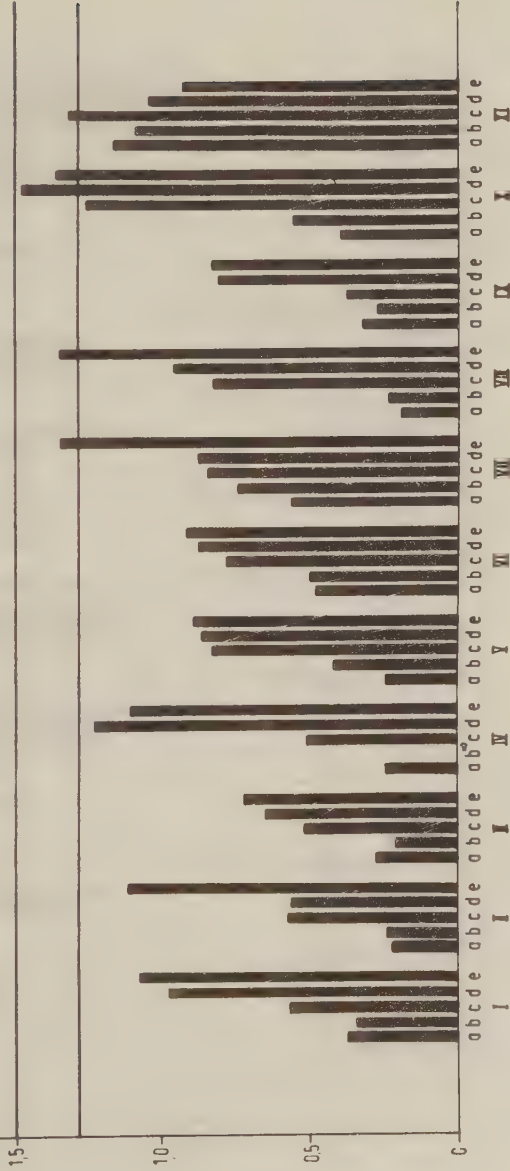


Tafel 3

Hämolysehemmungsversuch Nr. 2
16. Tag

→ Der Meßwert mußte wegen unsterilen
Rohrcheninhalts verworfen werden !
Die Querlinien geben den höchsten und niedrigsten
Meßwert der Kontrollen an

- I = Cortisonacetat
II = Solu-Decorin-H
III = Methyltestosteron
IV = Fortecortin
V = 11-epi-Hydrocortison
VI = Presuren
VII = Ostradiol
VIII = Testosteron
IX = 11-Desoxycorticosteron
X = Ergosterin
XI = Cholesterin
- a = 10 millimolar
b = 05
c = 01
d = 005
e = 001



Ext

2,5

2,0

1,5

1,0

0,5

0

Tafel 4

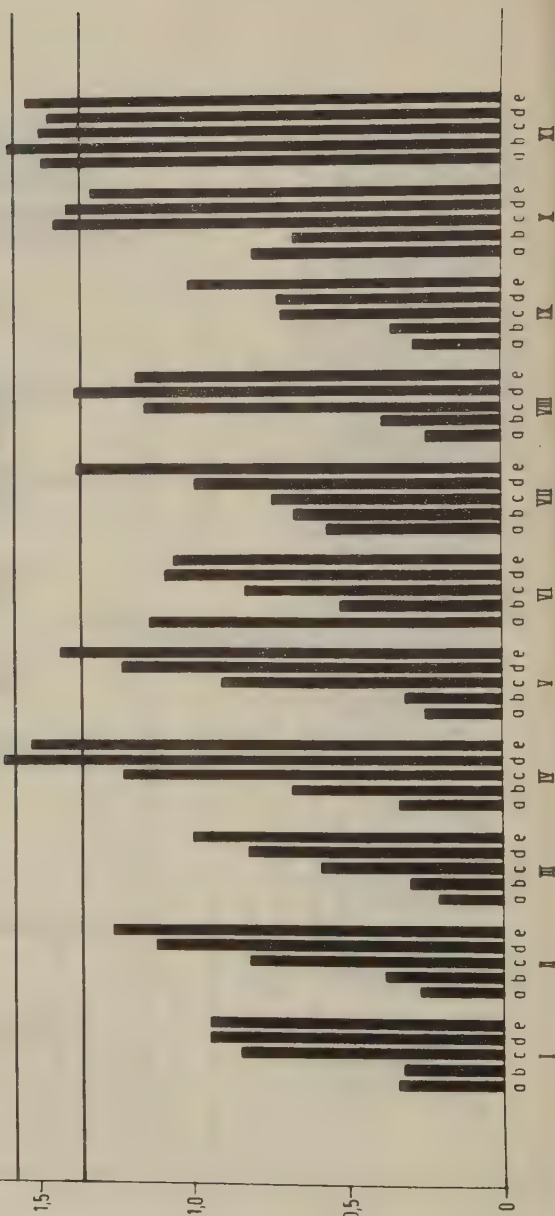
Hämolysehemmungsversuch Nr. 2

18. Tag

Die Querlinien geben den höchsten und niedrigsten
Messwert der Kontrollen an.

I = Cortisonacetat
II = Solu-Decortin-H
III = Methyltestosteron
IV = Fortecortin
V = 11-epi-Hydrocortison
VI = Presuren
VII = Oestradiol
VIII = Testosteron
IX = 11-Desoxycorticosteron
X = Ergosterin
XI = Cholesterin

a = 1,0 millimolar
b = 0,5
c = 0,1
d = 0,05
e = 0,01



Tafel 5

Hämolysehemmungsversuch Nr. 3

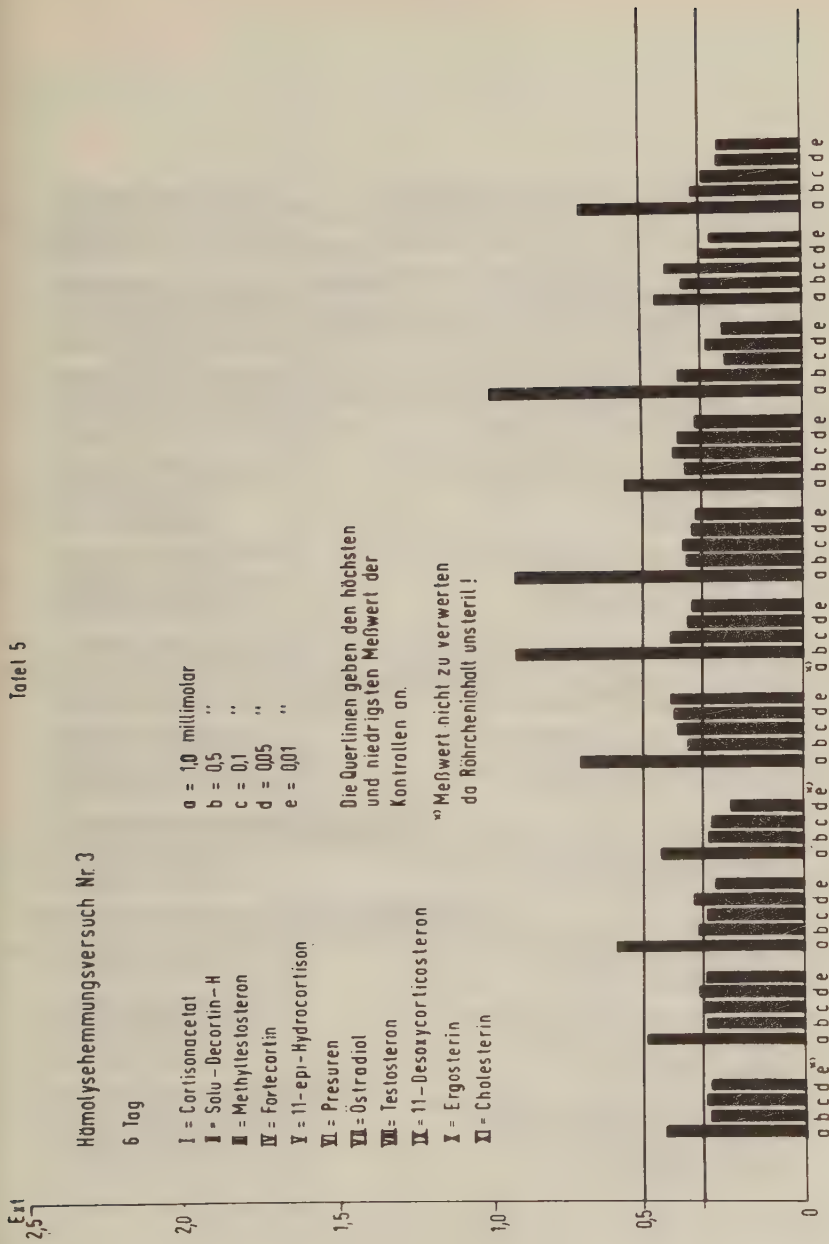
6 Tag

- I = Cortisonacetat
- II = Solu-Decortin-H
- III = Methyltestosteron
- IV = Fortecortin
- V = 11-epi-Hydrocortison
- VI = Presuren
- VII = Östradiol
- VIII = Testosteron
- IX = 11-Desoxycorticosteron
- X = Ergosterin
- XI = Cholesterin

- a = 1,0 millimolar
- b = 0,5 "
- c = 0,1 "
- d = 0,05 "
- e = 0,01 "

Die Querlinien geben den höchsten und niedrigsten Meßwert der Kontrollen an.

^{*)} Meßwert nicht zu verwerten da Röhrcheninhalt unsteril!



Ext.

25

20

15

1,0

0,5

0

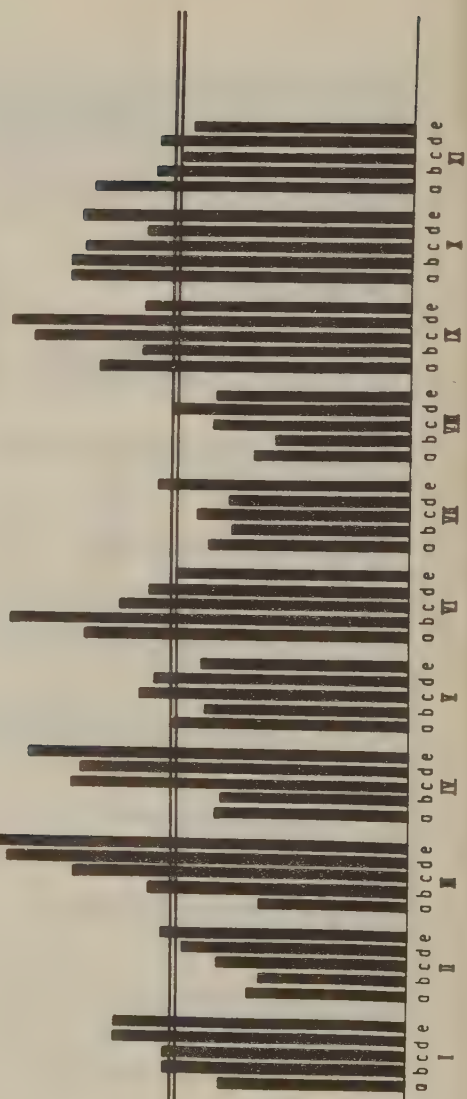
Tafel 6

Hämolysehemmungsversuch Nr. 3

11. Tag

Die Querlinien geben den höchsten und niedrigsten Meßwert der Kontrollen an.

- I = Cortisonacetat
- II = Solu-Decortin - H
- III = Methyltestosteron
- IV = Fostecortin
- V = 11-epi-Hydrocortison
- VI = Presuren
- VII = Östradiol
- VIII = Testosteron
- IX = 11-Desoxycortico-steron
- X = Ergosterin
- XI = Cholesterin



Tafel 7

Hämolysehemmungsversuch Nr. 3

15. Tag

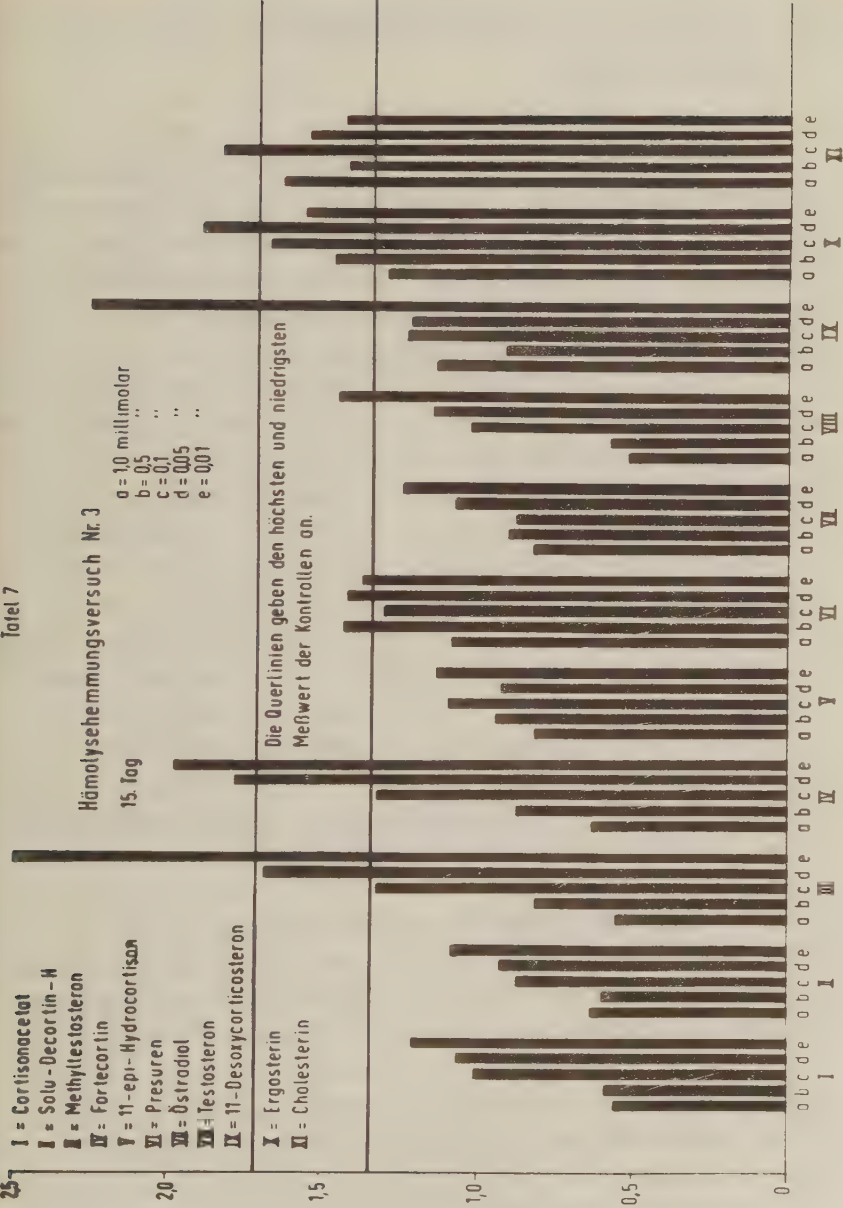
a = 1,0 millimolar
b = 0,5
c = 0,1
d = 0,05
e = 0,01

- I = Cortisonacetat
II = Solu-Decortin-H
III = Methyltestosteron
IV = Fortecortin
V = 11-epi-Hydrocortison
VI = Presuren
VII = Östradiol
VIII = Testosteron
IX = 11-Desoxycorticosteron

- X = Ergosterin
XI = Cholesterin

Die Querlinien geben den höchsten und niedrigsten Meßwert der Kontrollen an.

Ext



II. Konservierungsversuche mit Zusatz von Nucleosiden und Steroiden:

Versuch Nr.1

Der auf den Tafeln Nr. 8, 8a und 9 gezeigte Versuch hat zum Ziel, die Wirkung eines Zusatzes von Inosin, Inosin + Adenin, Inosin + Adenin + Guanosin (IAG) und Solu-Decortin auf alternde Erythrocyten zu vergleichen, wobei als Vergleichsgrößen der ATP-Gehalt und der Hämolysegrad der Zellen gewählt wurden.

Der ATP-Spiegel aller Konserven fällt kontinuierlich ab, doch während Inosin und Solu-Decortin bei 30 Tage alten Erythrocyten keine Wirkung mehr aufweisen, liegt der ATP-Gehalt der Inosin-Adenin-Konserve etwas, der der IAG-Konserve deutlich höher als der der Kontrollkonserve und ist erst nach 57 Tagen etwa auf die gleichen Werte abgesunken wie in den ACD-konserven.

Werden die Erythrocyten vor der ATP-Bestimmung eine Stunde lang auf 37°C erwärmt, so zeigt sich dieser Effekt noch deutlicher. Während der ATP-Gehalt der Inosin- und Solu-Decortin-Konserve nach 36 Tagen nicht mehr höher liegt als der der Kontroll- (ACD-) Konserve, zeigt die Kombination Inosin-Adenin noch nach 48 Tagen eine geringe Überlegenheit. IAG dagegen ist noch nach 57 Tagen deutlich überlegen.

Auch die Hämolyse wird sinngemäß beeinflusst. Bis zum 28. Tag steigt bei allen Konserven der Hämolysegrad allmählich an, von da ab setzt in der ACD-Konserve eine beschleunigte Hämolyse ein. Diese wird durch Zusatz von Solu-Decortin erheblich gehemmt, auch die übrigen Zusätze bewirken eine deutliche Verzögerung der Hämolyse, wobei IAG nicht ganz so wirksam ist wie Solu-Decortin, aber wirksamer als Inosin-Adenin und dieses wieder wirksamer als Inosin allein.

Der Versuchsverlauf läßt also den Schluß zu, daß IAG von allen verwandten Zusätzen am besten geeignet

ist, den Zerfall der Erythrocyten hinauszuzögern.

Versuch Nr.2

Hier soll, wie die zugehörigen Tafeln Nr.10 und 11 zeigen, untersucht werden, ob die Kombination von Steroiden mit Nucleosiden einen günstigeren Einfluß auf alternde Erythrocyten ausübt als der Zusatz von Steroiden oder Nucleosiden allein.

Auch hier erkennt man, daß der ATP-Spiegel der ACD-Konserve, der der Solu-Decortin-Konserve und der der 11-epi-Hydrocortison-Konserve bis zum 15. Tag ziemlich steil abfällt und sich von da ab kaum noch ändert. Die Kombination Solu-Decortin + Inosin, 11-epi-Hydrocortison + Inosin, sowie der alleinige Zusatz von Inosin bewirken zunächst einen ATP-Anstieg bis zum 8. Tag. Danach fällt der ATP-Spiegel dieser drei Konserven wieder ab und erreicht am 15. Tag wieder den Ausgangswert der frischen Konserve. Während der ATP-Gehalt der Inosin-Konserve nun allmählich absinkt, dabei aber gegenüber der ACD-Kontrolle und gegenüber den Konserven mit alleinigem Steroidzusatz deutlich erhöht bleibt, kommt es bei kombiniertem Nucleosid-Steroid-Zusatz praktisch zu keinem ATP-Verlust bis zum 48. Tag. Erst dann erschöpft sich auch hier die ATP-Reserve der Erythrocyten. Man kann also sagen, daß Solu-Decortin oder 11-epi-Hydrocortison allein keinen Einfluß auf den ATP-Gehalt der Erythrocyten hat, während Inosin, wie bekannt, den ATP-Verlust merklich verzögert. Solu-Decortin oder 11-epi-Hydrocortison kombiniert mit Inosin sind dem alleinigen Zusatz von Inosin jedoch deutlich überlegen.

Auch bei diesem Versuch werden die Auswirkungen der verschiedenen Zusätze durch die gleichzeitige Bestimmung des Hämolysegrades bestätigt. Bereits Solu-Decortin und 11-epi-Hydrocortison hemmen den hämolytischen Zerfall der roten Blutzellen, noch viel ausgeprägter ist dieser Effekt aber beim Inosin und den Kombina-

tionen Solu-Decortin + Inosin und 11-epi-Hydrocortison + Inosin.

Versuch Nr.3

Der Versuch, dargestellt auf den Tafeln Nr.12 und 13, stellt eine geringe Modifikation des vorigen dar. Da ein IAG-Zusatz wirksamer ist als der von Inosin allein, soll nun untersucht werden, ob eine Kombination von IAG mit Solu-Decortin oder mit 11-epi-Hydrocortison ebenfalls wirksamer ist als eine Kombination von Inosin mit Solu-Decortin oder mit 11-epi-Hydrocortison.

Während, wie schon aus den vorhergegangenen Versuchen zu ersehen, alleiniger Zusatz von Steroiden auf den ATP-Gehalt der Konserven keinen Einfluß hat, weisen die Konserven mit einem IAG- oder kombinierten IAG-Steroid-Zusatz bis zum 34. Tag einen nahezu konstanten ATP-Gehalt auf; erst dann beginnt der ATP-Spiegel dieser Konserven langsam zu fallen, ist aber am 52. Tag immer noch rund sechsmal so hoch wie der der Kontrollkonserve. Es zeigt sich dabei, daß es nahezu bedeutungslos ist, ob der Konserve IAG allein oder IAG kombiniert mit einem der beiden Steroide zugesetzt wurde; der Effekt ist in allen drei Fällen der gleiche.

Auch die Hämolyse wird durch einen Zusatz von IAG allein oder IAG kombiniert mit einem der beiden Steroide deutlich verzögert, während der Zusatz von Solu-Decortin oder 11-epi-Hydrocortison allein wesentlich weniger wirksam ist. Eine ähnliche Beobachtung konnte man bereits beim vorherigen Versuch machen.

Man kann sagen, daß ein Zusatz von IAG den ATP-Verlust und die Hämolyse der Erythrocyten erheblich zu verzögern vermag, daß aber ein weiterer Zusatz von Solu-Decortin oder 11-epi-Hydrocortison keine weitere Verbesserung der Lagerungsfähigkeit der Erythrocyten bewirkt. Der Zusatz von Steroiden allein ist, von einer geringen Hämolysehemmung abgesehen, unwirksam.

Versuch Nr.4

Im folgenden Versuch, abgebildet auf den Tafeln Nr.14 und 15, soll geprüft werden, ob es möglich ist, bereits 20 Tage alte Erythrocyten mit IAG "aufzuheizen", das heißt, den bereits abgesunkenen ATP-Spiegel wieder anzuheben. Außerdem erhebt sich die Frage, ob die erneute IAG-Zufuhr die Lagerungsfähigkeit der Erythrocyten weiter verbessert.

Bis zum 20. Tag ist der ATP-Spiegel in der ACD-, der Solu-Decortin- und der 11-epi-Hydrocortison-Konserve von 18 mg% auf 11 mg% gefallen, in der IAG-Konserve ist er leicht angestiegen (19 mg%).

Wird nun einem Teil der Konserven nochmals IAG zugesetzt, so zeigt es sich, daß in diesen Konserven bis zum 28. Tag ein erheblicher Anstieg des ATP-Spiegels zu verzeichnen ist. Erst dann fällt der ATP-Gehalt wieder langsam ab. Am 44. Tag weisen die Konserven wieder den ATP-Gehalt der frischen Konserve auf.

Bei den nicht mit IAG behandelten Konserven fällt dagegen der ATP-Spiegel weiterhin kontinuierlich ab und beträgt am 44. Tag etwa 6 mg%, also rund ein Drittel des Ausgangswertes. Am 56. Tag ist der Spiegel bis auf 2 bis 4 mg% abgesunken, während die entsprechenden, mit IAG nachbehandelten Konserven Werte von 9 bis 13 mg% aufweisen.

Eigenartigerweise bewirkt jedoch ein weiterer Zusatz von IAG zur IAG-Konserve keinen weiteren Anstieg des ATP-Spiegels, im Gegenteil, der erneute Zusatz von IAG wirkt sich eher negativ aus. Die nicht "aufgeheizte" IAG-Konserve ist jedoch allen anderen überlegen. In ihr steigt die ATP bis zum 28. Tage auf Werte von 26 mg% an und fällt dann bis zum 68. Tage ganz allmählich auf 13 mg% ab.

Die Ergebnisse der ATP-Bestimmung werden auch hier durch die Bestimmung des Hämolysegrades bekräftigt.

Während in der ACD-Konserve nach dem 20. Tag

ein rapider Anstieg des extrazellulären Hämoglobins zu beobachten ist, ist dieser Anstieg, - wie schon mehrfach beobachtet - in der Solu-Decortin- und der 11-epi-Hydrocortisonkonserve geringer. Noch günstiger wirkt der erneute Zusatz von IAG zur ACD-, Solu-Decortin- und 11-epi-Hydrocortison-Konserve am 20. Tag. Während in der nachbehandelten ACD-Konserve die Hämolyse etwa der in den Steroidkonserven ohne erneuten IAG-Zusatz entspricht, wird die Hämolyse durch sofortigen Zusatz von Solu-Decortin oder 11-epi-Hydrocortison und nachfolgende Behandlung mit IAG noch weiter verzögert. Auch hier kann man aber erkennen, daß ein erneutes "Aufheizen" der IAG-Konserve eher eine nachteilige Wirkung hat.

Versucht man das Experiment zu beurteilen, so kann man sagen:

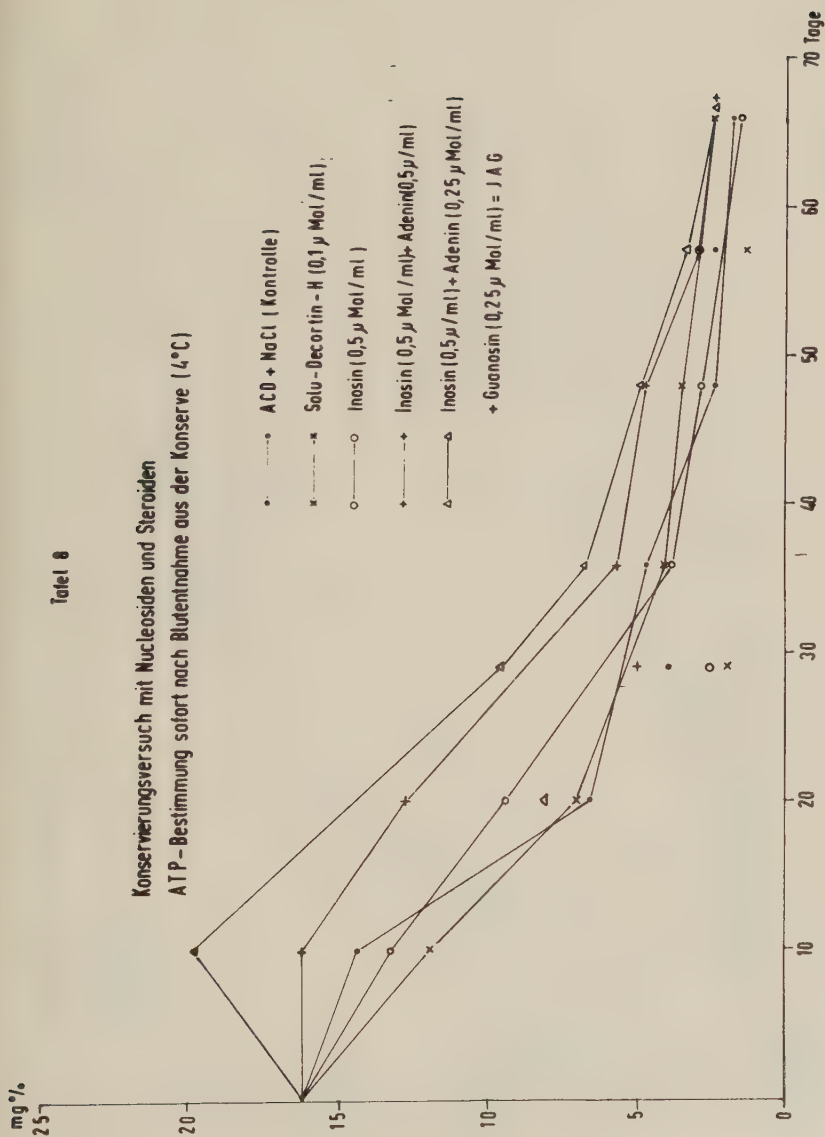
Solu-Decortin und 11-epi-Hydrocortison bewirken nur eine mäßige Hemmung der Hämolyse, vermögen aber nicht den Verlust an ATP zu verhindern. Setzt man diesen beiden Steroidkonserven nach 20 Tagen IAG zu, bewirkt dies einmal einen erheblichen Anstieg des ATP-Spiegels, zum andernmal eine weitere, erhebliche Verzögerung der Hämolyse. Allen diesen Zusätzen ist ein sofortiger Zusatz von IAG zum Frischblut überlegen; "aufheizen" dieser IAG-Konserve nach 20 Tagen hat eher einen nachteiligen Einfluß.

Tafel 8

Konservierungsversuch mit Nucleosiden und Steroiden

ATP-Bestimmung sofort nach Blutentnahme aus der Konserve (4°C)

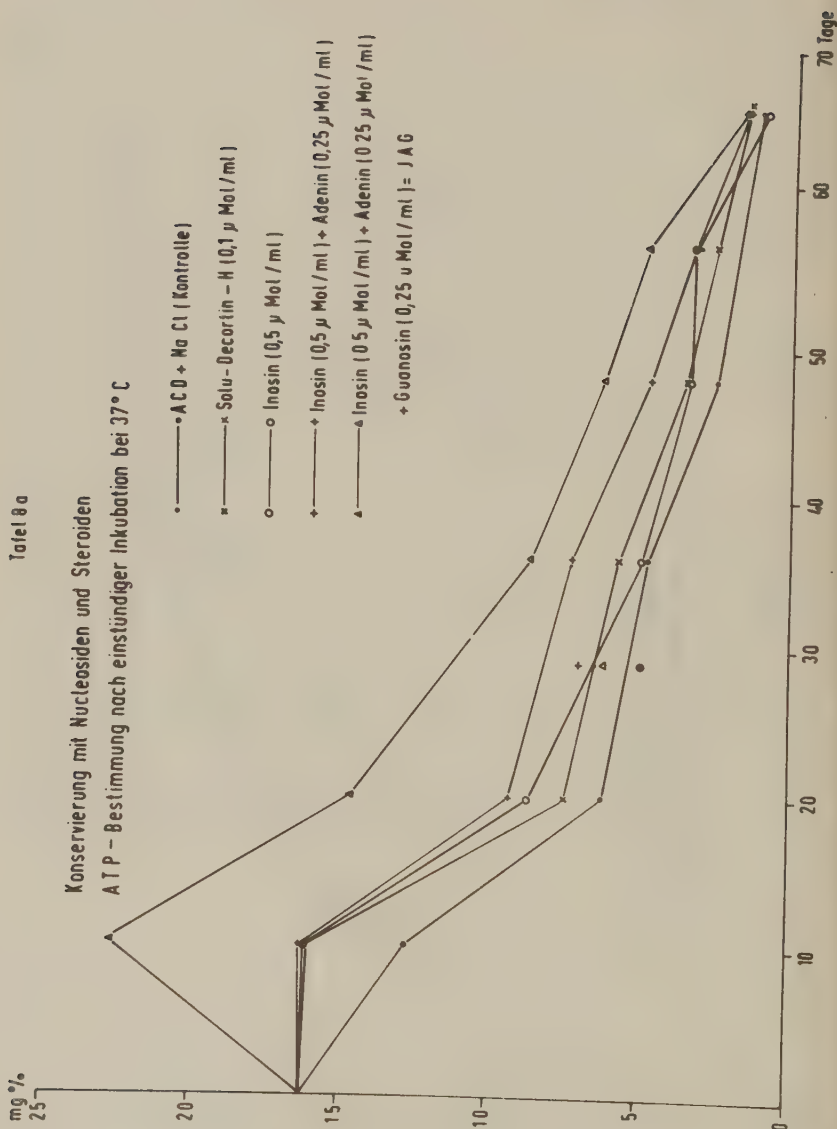
- ACD + NaCl (Kontrolle)
- x Solu-Decortin-H ($0,1 \mu\text{ Mol/ml}$)
- Inosin ($0,5 \mu\text{ Mol/ml}$)
- + Inosin ($0,5 \mu\text{ Mol/ml}$) + Adenin ($0,5 \mu\text{ Mol/ml}$)
- △ Inosin ($0,5 \mu\text{ Mol/ml}$) + Adenin ($0,25 \mu\text{ Mol/ml}$) + Guanosin ($0,25 \mu\text{ Mol/ml}$) = JAG

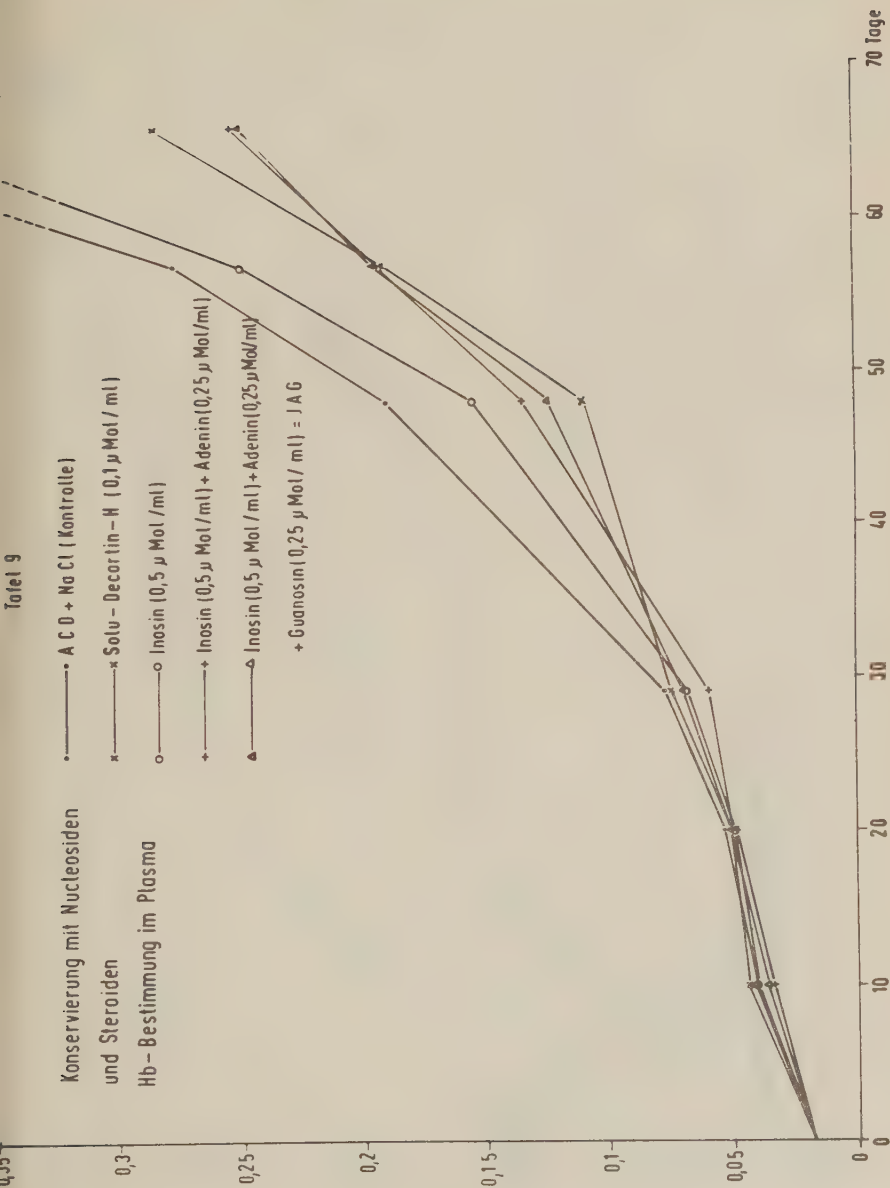


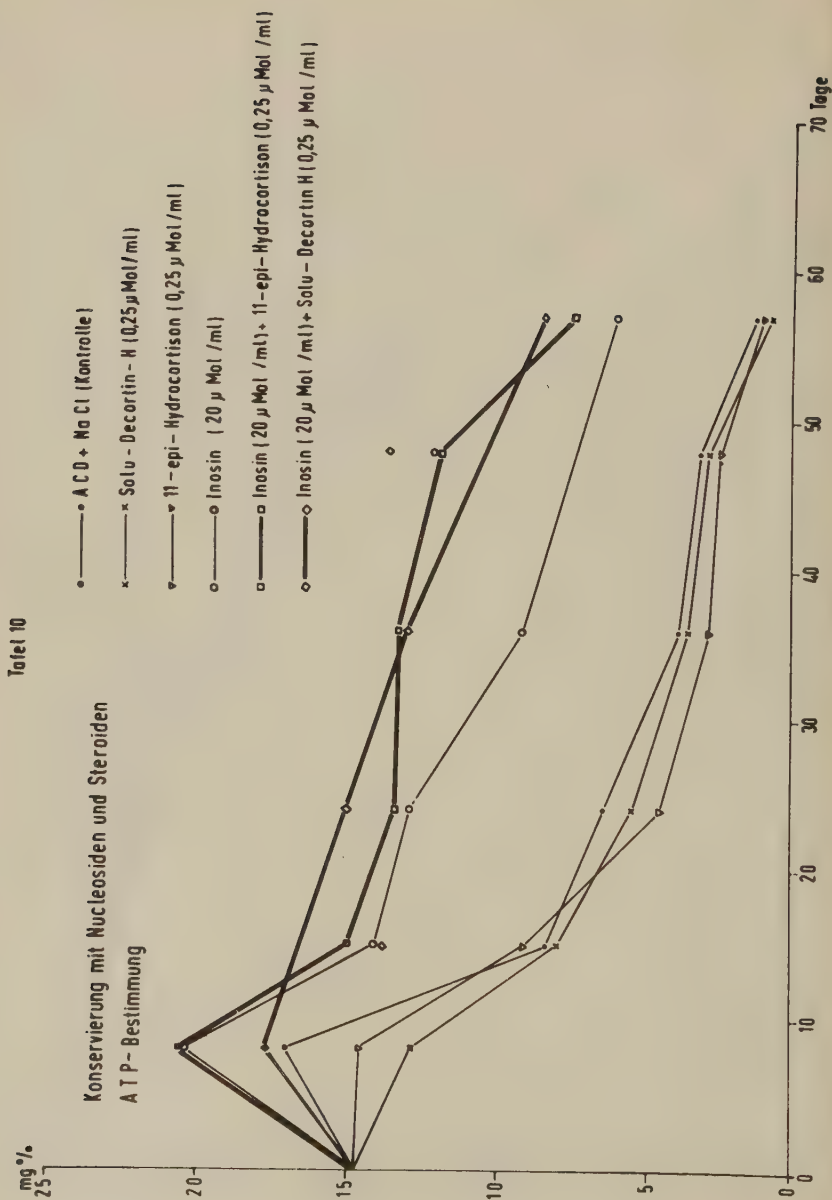
Tafel 8 a

Konservierung mit Nucleosiden und Steroiden

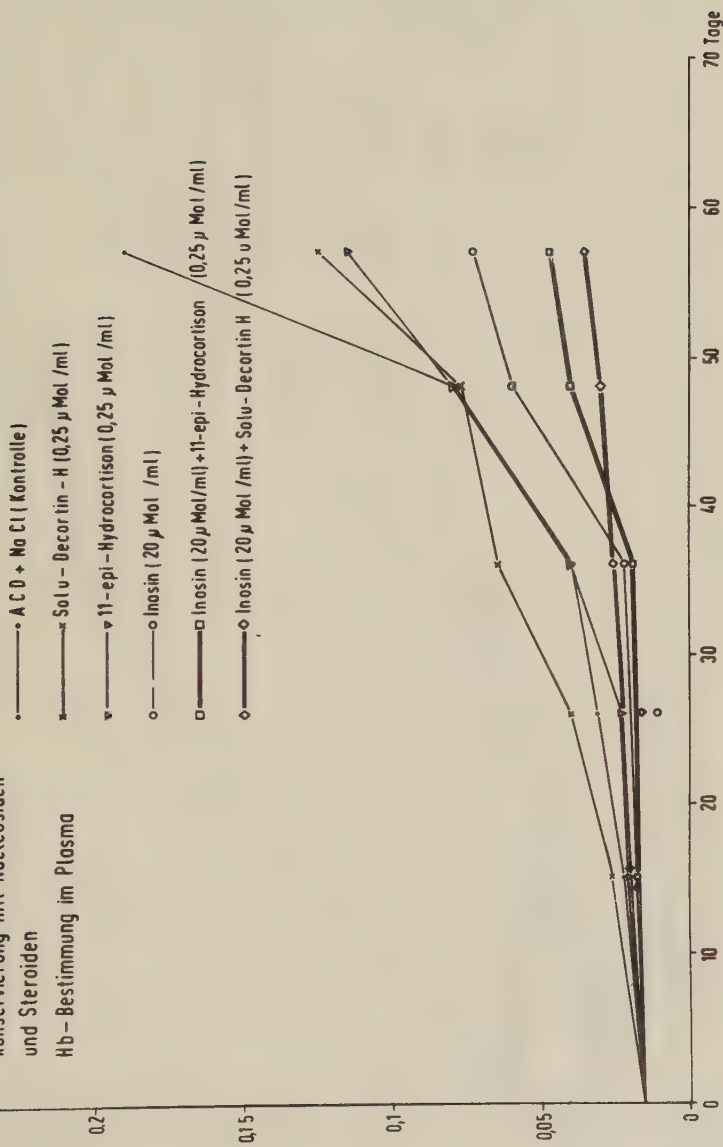
ATP - Bestimmung nach einstündiger Inkubation bei 37° C







Konservierung mit Nucleosiden
und Steroiden
Hb-Bestimmung im Plasma



Tafel 12

Konservierung mit Nucleosiden und Steroiden
ATP-Bestimmung

mg%

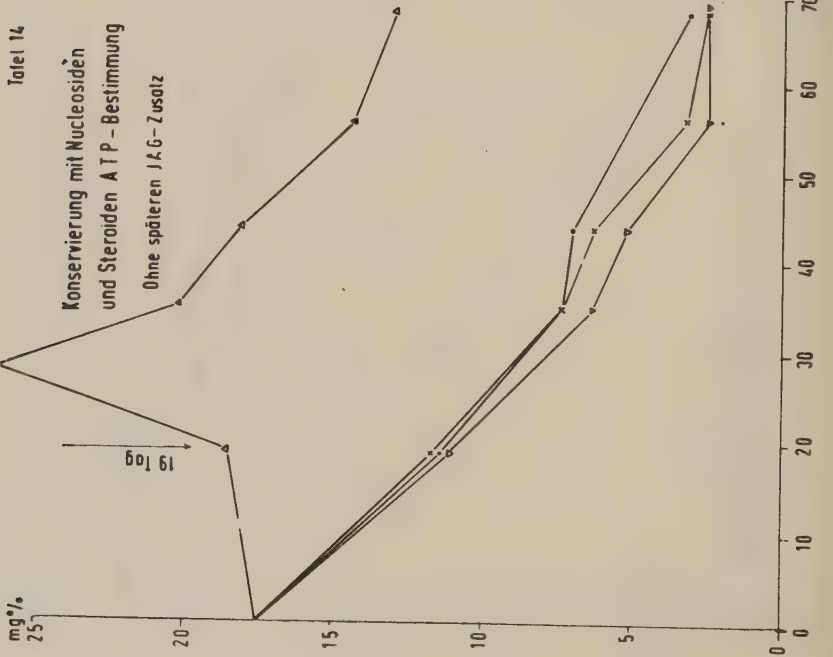


70 Tage

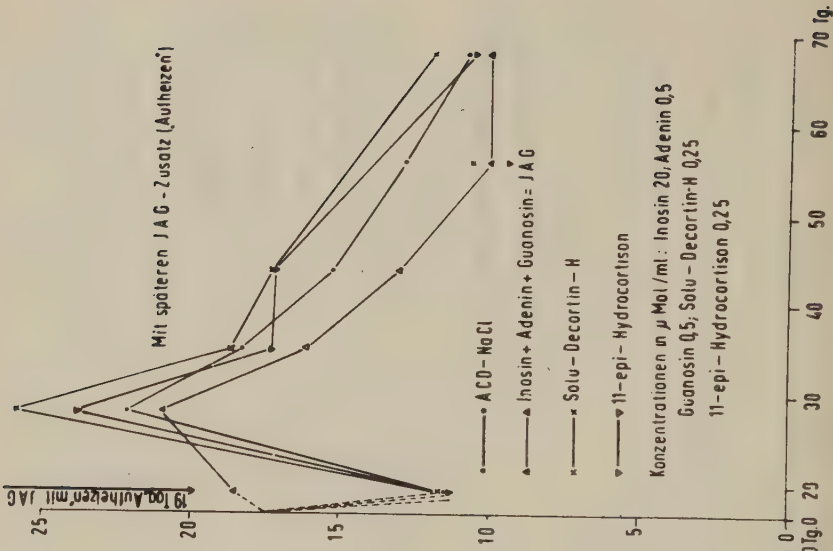
Tafel 14

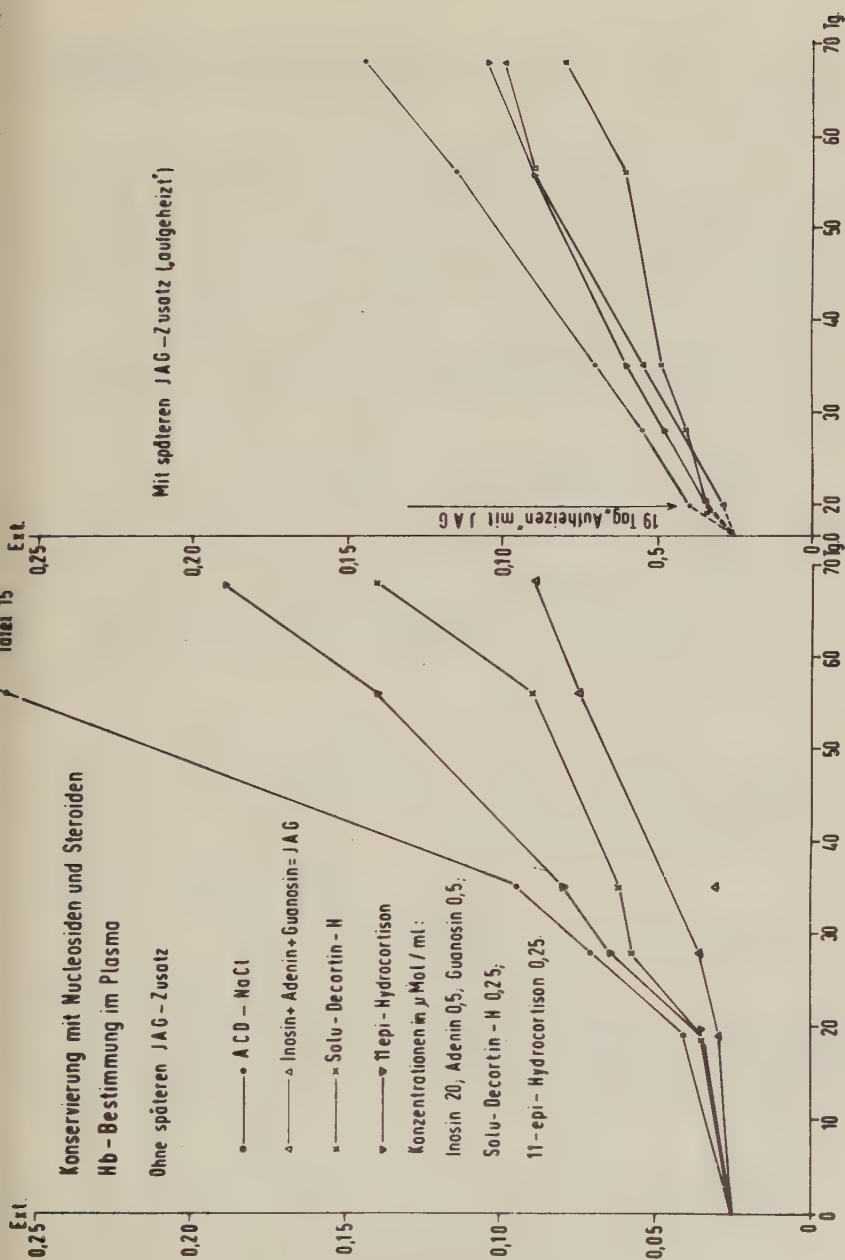
Konservierung mit Nucleosiden
und Steroiden ATP-Bestimmung

Ohne späteren JAG-Zusatz



Mit späteren JAG-Zusatz (Aufheizen)





Versucht man die geschilderten Experimente insgesamt zu beurteilen, so kommt man zu folgenden Ergebnissen:

1.) Unter den untersuchten Steroiden erweisen sich Cortisonacetat und Solu-Decortin-H eindeutig als hämolysehemmend. Das gleiche gilt für 11-epi-Hydrocortison, wenn auch in geringerem Ausmaß, während die Wirksamkeit der übrigen Steroide nicht eindeutig ist.

2.) Weder Solu-Decortin-H, noch 11-epi-Hydrocortison vermag das Absinken des ATP-Spiegels in den Erythrocyten zu verhindern, während ein Zusatz von Inosin dies vermag.

3.) Das Gemisch IAG ist dem Gemisch Inosin-Adenin und dieses wiederum dem alleinigen Zusatz von Inosin überlegen.

4.) Die konservierende Wirkung dieser drei Zusätze wird durch eine einstündige Inkubation bei 37°C noch etwas deutlicher, doch bewirkt die Inkubation keine wesentliche Verbesserung.

5.) Der kombinierte Zusatz von Inosin + Solu-Decortin-H oder Inosin + 11-epi-Hydrocortison verbessert die Lagerungsfähigkeit der Erythrocyten gegenüber einem isolierten Zusatz von Inosin.

6.) Solu-Decortin-H oder 11-epi-Hydrocortison kombiniert mit IAG erweisen sich dagegen nicht wirksamer als der Zusatz von IAG allein.

7.) Ein Zusatz von IAG zu 20 Tage alten Erythrocyten kann einen entstandenen Lagerungsschaden weitgehend aufheben, er verbessert aber nicht die Lagerungsfähigkeit der IAG-Konserve, sondern verschlechtert sie eher noch.

D) Diskussion:

Ausgehend von älteren Arbeiten T e r b r ü g - g e n s (57), E l m o r e s (7), R o b e r t s o n s (43) und P i l l e m e r s (35;36;37;60), konnten F i s c h e r , F r i t z s c h e und A r g e n t o n zeigen, daß in homologem Serum inkubierte Erythrocyten aufgelöst werden und daß diese Lyse durch eine Vorschädigung mit proteolytischen Fermenten des Serums noch verstärkt wird (12;13). Es gelang ihnen weiterhin nachzuweisen, daß auch Kernproteine wie Protamin und Histon die Erythrocyten gegenüber den lysierenden Serumfaktoren Komplement und Properdin anfälliger machen, und sie schlossen daraus, daß es bei Prozessen mit gesteigertem Zellzerfall oder gesteigerter fibinolytischer Aktivität auch in vivo zu einem gesteigerten Abbau roter Blutkörperchen komme, ja daß das Komplement-Propertdin-System überhaupt einen entscheidenden Einfluß auf die Blutmauerung haben müsse (12;13).

Es gelang den Autoren ferner nachzuweisen, daß Adenosin die Hämolyse sowohl normaler, als auch vorgeschädigter Erythrocyten zu verzögern vermag (12;13;14), was bedeutet, daß Adenosin die Überlebenszeit der roten Blutkörperchen verlängert.

Von einer anderen Fragestellung ausgehend fanden auch P r a n k e r d (40), P r a n k e r d und A l t m a n (39), und G a b r i o , F i n c h und H u e n n e k e n s (19), daß Adenosin die Überlebenszeit gealterter Erythrocyten wesentlich zu verlängern vermag.

Sie gingen dabei von D i s c h e s Arbeiten aus, der gezeigt hatte, daß in Hämolysaten von Säugerythrocyten bei Gegenwart von NaF aus Adenosin Ribose-5-Phosphat, Fructose-1,6-Diphosphat, Hexosemonophosphat und Triosephosphat gebildet wird. D i s c h e schloß daraus, daß im Erythrocyten der Säugetiere eine Nucleo-

sidphosphorylase enthalten sein müsse, welche die Reaktion Adenosin $\longrightarrow$ Adenin + Ribose-1-Phosphat katalysiert. Auf diese Weise kann der Riboseanteil des Adenosins in den WDH-Shunt und schließlich in die Glykolysekette eingeschleust werden (28;38).

P r a n k e r d und A l t m a n stellten fest, daß ein Zusatz von Adenosin zu Erythrocyten den Austausch von P^{32} zwischen der Zelle und dem Plasma auch in Abwesenheit von Glucose ermöglicht und daß der Phosphor in die organischen Phosphatester der Zelle, vornehmlich in die 2,3-DPGS eingebaut wird. Sie fanden weiter, daß auch in Gegenwart eines Glucoseüberschusses im Inkubationsmedium nach einer sechzehnständigen Inkubation bei $37^{\circ}C$ der Gehalt an organischen Phosphatestern in der Zelle abnimmt, daß dieser Verlust aber durch Adenosin oder Guanosin vermieden werden kann (39).

P r a n k e r d lagerte Erythrocyten und stellte fest, daß die Glucoseverwertung nach drei Wochen aufhört (40). Zum gleichen Ergebnis kamen G a b r i o , F i n c h und H u e n n e k e n s (19), sowie später noch R u b i n s t e i n , K a s h k e t und D e n s t e d t (47) und W o s e g i e n und F i s c h e r (61).

R u b i n s t e i n , K a s h k e t und D e n s t e d t erklären die mangelnde Glucoseverwertung durch die pH-Empfindlichkeit der Hexokinase; die in den Konserven ansteigende Milchsäurekonzentration bewirke einen pH-Abfall und damit eine Blockade der Hexokinase (47).

L ö h r und W a l l e r bemerkten in intravital und auch bei in vitro alternden Erythrocyten einen Anstieg der O_2 -Aufnahme und ein Absinken des Respirationsquotienten und schlossen daraus, daß die Zuckerverwertung zugunsten der Fettverbrennung absinke (27).

Sie berichten weiterhin, daß in beiden Fällen die Aktivität der PGADH (oxydierendes Gärungsferment)

und der G-6-PDH stark abfällt und der ATP-Spiegel in dem Augenblick sinkt, in dem die Aktivität der genannten Enzyme um 70% abgesunken ist. PGADH und G-6-PDH bilden somit limitierende Faktoren für die Zuckerverwertung (27).

Für diese Beobachtungen sprechen auch die Ergebnisse von B l u m , der in gelagerten Erythrocyten einen Anstieg des F-1,6-DP (Fructose-1,6-Diphosphat) und des DAP (Dihydroxyaceton-Phosphat) fand (3). In seinen Untersuchungen über die Stoffwechselveränderungen in alternden Erythrocyten berichtet auch P r a n k e r d von einem leichten Anstieg des F-1,6-DP (40).

Nach L ö h r und W a l l e r , sowie nach G a b r i o , F i n c h und H u e n n e k e n s folgen dabei die Veränderungen dem "Alles-oder-Nichts-Gesetz", das heißt, wenn die Erythrocyten vor Erreichen der kritischen Alterungsgrenze wieder infundiert werden, bildet sich der Lagerungsschaden vollständig zurück, danach kommt es zum Abbau der geschädigten Erythrocyten (19;27).

Wie schon erwähnt, berichten P r a n k e r d , P r a n k e r d und A l t m a n , G a b r i o , F i n c h und H u e n n e k e n s , R u b i n - s t e i n , K a s h k e t und D e n s t e d t , W o s e g i e n und F i s c h e r (19;39;40;47;48;61) und noch einige andere Autoren (3;14;17;18;27;32;51;54), daß man die Schädigung alternder Erythrocyten verzögern kann. R u b i n s t e i n et al. (47;48;49) fanden, daß auch Inosin einen Schutzeffekt auf alternde Erythrocyten ausübt. Dieser Befund konnte von zahlreichen anderen Autoren bestätigt werden (3;14;15;21;23;28;32;61). Dabei kommt es unter der Inosinwirkung zu einer bevorzugten Ausnutzung von Ribose, während Adenosin besonders die Glucoseverwertung fördert, weil es, wie auch von S c h m i t t berichtet wird, zu Inosin desaminiert wird und das freigesetzte NH_3 das pH der Konserve wieder mehr nach der basischen Seite verschiebt. Dadurch aber

wird die Hexokinaseaktivität erhöht und mit ihr die Glucoseverwertung verbessert (48;51).

R u b i n s t e i n und Mitarbeiter sind der Ansicht, daß bei Zusatz von Adenosin zunächst die Glucoseverwertung aufrecht erhalten werde, und erst wenn die Glucose verbraucht oder das gesamte Adenosin zu Inosin desaminiert worden ist und damit das pH fällt, komme der zweite Stoffwechselweg, nämlich die Riboseverwertung über den Pentosephosphatshunt, in Gang (48).

Für diese Annahme spricht auch die Entdeckung W o s e g i e n s und F i s c h e r s , die berichten, daß Inosinzusatz bis zum 50. Tage zu einer Regeneration von ATP führt, während Adenosin noch über den 50. Tag hinaus den ATP-Spiegel aufrecht zu erhalten vermag. Die beiden Autoren untersuchten daher eine Kombination von Inosin + Adenin und kamen zu dem Ergebnis, daß diese Kombination dem alleinigen Zusatz von Adenosin oder Inosin überlegen ist (61).

Auch N a k a o , N a k a o , T a t i b a n a , Y o s h i k a w a und A b e berichten, daß eine Kombination Inosin + Adenin wirksamer sei als der Zusatz eines der beiden Nucleoside für sich. Sie nehmen an, daß das Adenin den Adeninanteil der gebildeten ATP stellt, während der Riboseanteil des Inosins über den Pentosephosphatweg in die Glykolysekette einmündet und die für die Phosphatsynthese erforderlichen Glykolysemetabolite stellt (32).

Adenosin allein ist, wie G a b r i o , F i n c h und H u e n n e k e n s fanden, an sich unwirksam, weil die Nucleosidphosphorylase für Inosin und Guanosin spezifisch ist; das Adenosin muß also in jedem Falle erst zu Inosin desaminiert werden, ehe es von der roten Blutzelle verwertet werden kann (19).

In den in dieser Arbeit geschilderten Versuchen konnten die Ergebnisse der angeführten Autoren zum Teil bestätigt werden. Wie die Abbildungen zeigen, führt

der Zusatz von Inosin zu einer merklichen Steigerung des ATP-Gehalts der roten Blutkörperchen, also zu einer Synthese organischer Phosphate. Darüber hinaus wird die Hämolyse der alternden Konserven durch Inosin deutlich vermindert, ein Befund, der mit den Ergebnissen F i s c h e r s und seiner Mitarbeiter übereinstimmt (14).

Ebenso ließen sich die Versuchsergebnisse von N a k a o und Mitarbeitern und F i s c h e r und Mitarbeitern bestätigen, und es ließ sich zeigen, daß eine Kombination von Inosin + Adenin dem Zusatz von Inosin allein überlegen ist (14;32;61), während eine Kombination Inosin + Adenin + Guanosin (IAG) die Wirkung des Inosin-Adenin-Gemisches noch übertrifft (8;14).

Im Gegensatz zu den Resultaten P r a n k e r d s , N a k a o s , H o c k s und H u b e r s kommt es schon bei Zusatz von Inosin allein zu einem, wenn auch nur geringen Anstieg der ATP in der Zelle (21; 32;40).

Die genannten Autoren berichten, daß Adenosin- oder Inosinzusatz nur zu einer Steigerung der Synthese von 2,3-DPGS führt, die gewissermaßen ein Reservoir darstellt (28;40), das für die Synthese von ATP erst angegriffen werden kann, wenn der Erythrocyt wieder in den Blutkreislauf zurückkommt. Nach ihrer Ansicht ist die Verwertung der Triosephosphate unterhalb des GAP gestört (3;27).

Es ist aber nicht einzusehen, warum noch 2,3-DPGS gebildet werden soll, wenn die Reaktion Glycerinaldehydphosphat (GAP) $\longrightarrow$ 1,3-Diphosphoglycerinsäure (1,3-DPGS) durch einen Aktivitätsverlust der Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase (PGADH) ausfällt, da allgemein bekannt ist, daß 2,3-DPGS als Intermediärprodukt bei der von der Phosphoglyceratmutase katalysierten Reaktion 3-PGS $\longrightarrow$ 2-PGS entsteht, wobei die 3-PGS ihrerseits aus der 1,3-DPGS gebildet wird (Edlbacher-Leuthardt: Lehrb. physiol. Chemie 1957, S.282 und 292).

Bei der Dephosphorylierung $1,3\text{-DPGS} \longrightarrow 3\text{-PGS}$ wird ein Phosphatrest durch die Büchersche Phosphotransferase auf ADP übertragen und so ein Molekül ATP gebildet. Es wäre sonst auch nicht einzusehen, warum, wie auch P r a n k e r d berichtet, bei sechs Wochen alten Erythrocyten infolge von Adenosinzusatz die ATP verbrauchende Hexokinase-reaktion wieder in Gang kommt.

Der Aktivitätsverlust der PGADH kann daher nicht so extrem sein, daß er die Verwertung der Triosephosphate völlig verhindert, sonst könnten weder ATP noch $2,3\text{-DPGS}$ gebildet werden. Daß der Aktivitätsverlust der PGADH nicht primär den limitierenden Faktor in der Stoffwechselkette darstellt, konnte F r i t z s c h e kürzlich beweisen (15).

Es wäre nun verständlich, daß in dem Augenblick, in dem durch Zusatz von Nucleosiden zu alternden Erythrocyten vermehrt $2,3\text{-DPGS}$ gebildet wird, auch vermehrt ATP gebildet werden muß. Das ist jedoch nicht der Fall. Der Erythrocyt beschreitet, wie Untersuchungen R a p o p o r t s und N i e r a d t s ergaben, einen anderen Stoffwechselweg. Nur rund 10% der angelieferten $1,3\text{-DPGS}$ werden über den normalen Weg $1,3\text{-DPGS} \longrightarrow 3\text{-PGS} \longrightarrow 2\text{-PGS}$ abgebaut, der weitaus größere Anteil wird über einen Nebenschluß verwertet. Aus der $1,3\text{-DPGS}$ entsteht mittels einer Diphosphoglyceratmutase $2,3\text{-DPGS}$, die dann durch eine Glycerat- $2,3$ -Diphosphatase zu 3-PGS und anorganischem Phosphat abgebaut wird (42).

Daraus ergibt sich die Folgerung, daß fast nur die Phosphopyruvatkinasereaktion zur Synthese von ATP beitragen kann und der Erythrocyt somit stets unter einem gewissen ATP-Mangel leidet. R a p o p o r t und N i e r a d t erklären dies damit, daß der Erythrocyt vorwiegend über einen Erhaltungsstoffwechsel verfügt und die geringe ATP-Menge ausreicht, um seinen Energiebedarf zu decken (42).

Andererseits muß dann aber die geringste Stö-

rung in der ATP-Synthese verhängnisvolle Folgen haben, und ein geringer Mangel an ATP muß, wie auch F r i t z - s c h e bestätigen konnte, zu einem Zusammenbruch des Stoffwechsels der roten Blutzelle führen (15).

Man könnte sich vorstellen, daß durch die Milchsäureproduktion das pH sinkt, damit die Hexokinaseaktivität vermindert wird und daraus wiederum eine verminderte Synthese von ATP resultiert. Dieser ATP-Mangel bedingt aber eine weitere Verschlechterung der Hexokinase-reaktion, sodaß sich ein circulus vitiosus ausbildet, der zu einem Zusammenbruch des gesamten Stoffwechsels der roten Blutzelle führt.

Führt man nun dem Erythrocyten Inosin zu, so kann er über die Nucleosidphosphorylase den Riboseanteil des Inosins in den Pentosephosphatshunt einschleusen und damit die Glykolyse vom Fructose-1,6-Diphosphat an aufrecht erhalten (3;17;19;28;32;38;48;51). Gleichzeitig spart er damit ein Molekül ATP ein, daß er sonst für die Phosphorylierung der Glucose benötigt; dieses Molekül ATP steht ihm nun für andere Zwecke als Reserve zur Verfügung. Damit wäre aber weiter erklärt, warum es bei Inosinzusatz zu einem Anstieg des ATP-Spiegels kommen muß.

Die Glucoseverwertung würde durch diesen Mechanismus allerdings nur insofern verbessert, als der Zelle wieder genügend ATP für den ersten Schritt der Glykolyse zur Verfügung stände, während die pH-Verschiebung und damit die unmittelbare Hemmung der Hexokinase nicht ausgeglichen werden könnte. Wahrscheinlich ist dies auch der Grund, warum ein Inosinzusatz die Fähigkeit der Zelle, Glucose zu verwerten, nur unwesentlich verlängert. Nach W o s e g i e n und F i s c h e r findet man in Konserven, die älter sind als 50 Tage, keine Glucoseverwertung mehr, während, wie R a p o - p o r t berichtet, etwa bis zum 30. Tage die Glykolyse nahezu ungestört abläuft und erst nach dem 40. Tag

völlig zum Erliegen kommt (41;61).

Bei Zusatz von Adenosin dagegen, wird durch die Desaminierung des Nucleosids NH_3 freigesetzt, welches das pH wieder nach der basischen Seite verschiebt und damit die Verwertung der Glucose ermöglicht (48). Dadurch aber ist der Erythrocyt viel länger in der Lage, Glucose zu verwerten und kann, wenn die Glykolyse nach vollständiger Desaminierung des Adenosins zum Erliegen kommt, immer noch das vorhandene Inosin verwerten.

Bei kombiniertem Zusatz von Inosin und Adenin ließe sich die Verbesserung der ATP-Synthese auf dieselbe Weise erklären. Durch die Desaminierung des Adenins zu Hypoxanthin kommt es zu einer Verschiebung des pH nach der basischen Seite und damit zu einer besseren Glucoseverwertung. Es ist aber nicht einzusehen, warum dann Inosin + Adenin wirksamer ist als Adenosin allein, da ja lediglich das freigesetzte NH_3 einen Einfluß auf den Stoffwechsel des Erythrocyten haben kann, während das entstehende Hypoxanthin nicht mehr weiterverwertet wird. Adenosin allein dient aber bereits als Ammoniaklieferant, und das daraus entstandene Inosin kann darüberhinaus im Pentosephosphatshunt eingeschleust werden. Nach Nakao et al. wird das Adenin aber direkt zur ATP-Synthese herangezogen, indem es den Purinanteil des Nucleotids stellt (32). Offenbar spielt dieser bisher noch weitgehend ungeklärte Mechanismus eine beachtliche Rolle bei der Regeneration des ATP-pools der roten Blutzelle, und es erhebt sich die Frage, ob nicht nur die erlöschende Fähigkeit AMP und ADP zu phosphorylieren ein Grund für den Mangel an ATP ist, sondern ob nicht auch ein Mangel an verfügbaren Purinbasen den initialen Mangel an organischen Phosphaten mitbedingt; - eine Frage, die allerdings noch zu überprüfen wäre.

Über den Wirkungsmechanismus des Guanosins ist bisher ebenfalls wenig bekannt. Man weiß, daß Guanosin, genau wie Inosin, direkt von der Nucleosidphosphorylase

umgesetzt werden kann (3;19). Es ist außerdem bekannt, daß auch Guanosin desaminiert werden kann (Edlbacher-Leuthardt, Lehrb. physiol. Chemie). Damit kann das Guanosin, genau wie das Adenosin, sowohl eine pH-Verschiebung bewirken, als auch die Bildung von Pentosephosphaten ermöglichen. Seine Wirkung muß also mindestens der des Adenosins entsprechen. Außerdem wird aber, wie B i s h o p fand, auch Guanosin unmittelbar in energiereiche Phosphate eingebaut. Das entstehende GTP könnte aber das Energiereservoir des Erythrocyten weiter auffüllen, sodaß auf diese Weise die Überlegenheit des Inosin-Adenin-Guanosin-Gemisches gegenüber dem Inosin- oder Inosin-Adeninzusatz zu erklären wäre (2).

Die verminderte Hämolyse gealterter Blutkonserven, die mit Purinnucleosiden beschickt wurden, läßt sich aus der gesteigerten Fähigkeit, ATP zu synthetisieren, erklären. Nach F l e c k e n s t e i n blockiert ein Mangel an energiereichen Phosphaten den aktiven Kationentransport der Zelle (10). Damit kommt aber eine der wesentlichsten Zellfunktionen zum Erliegen. Es muß nun bei einem Mangel an energiereichen Phosphaten zu einem Verlust an intrazellulärem K^+ und zu einem Einstromen von Na^+ kommen (3;17;19;26;27;34;40;41;54), und daraus resultiert wiederum eine verminderte osmotische und mechanische Resistenz der Zelle (8;14;41).

Wird aber die Synthese energiereicher Phosphate wieder in Gang gebracht, so kann die Ionenpumpe wieder in Gang gesetzt werden, das einströmende Natrium wird aus der Zelle herausgeschafft, das Kalium in der Zelle gespeichert. Je mehr energiereiche Phosphate aber gebildet werden, desto geringer wird die Fragilität der Zelle, desto geringer aber auch die Hämolyse sein.

An dieser Stelle mag noch ein anderer Mechanismus erörtert werden, der für die Erhaltung der Ionenverteilung in Frage kommt.

Wie schon erwähnt, vermochten F i s c h e r ,

F r i t z s c h e und A r g e n t o n die unspezifische Lyse protamingeschädigter Erythrocyten nicht nur durch Adenosin zu verhindern, sondern sie beobachteten auch einen Schutzeffekt bei Zusatz von Cortison (12;13).

Nach S e l y e besitzen eine Reihe von Steroiden lokalanaesthesierende Wirkung (52).

F l e c k e n s t e i n fand, daß Lokalanästhetika die Depolarisation der Grenzmembran, also K^{+} -Ausstrom und Na^{+} -Einstrom verhindern, mit anderen Worten Lokalanästhetika verändern die Permeabilität der Zellmembran (9).

Auch S z e n t - G y ö r g y betont, daß die intra- und extrazelluläre Ionenverteilung an die Durchlässigkeit der Zellmembran gekoppelt ist. Er weist ferner darauf hin, daß Herzglykoside einen Einfluß auf die Permeabilität der Zellmembran ausüben (56).

P a s s o w konnte bestätigen, daß Herzglykoside den Kationentransport der roten Blutkörperchen hemmen, ohne daß dabei ATP abgebaut wird (34).

Bei der chemischen Verwandtschaft der Aglucone der Herzglykoside und der Nebennierenrindenhormone liegt der Gedanke nahe, daß auch diese einen Einfluß auf den Ionentransport ausüben. Beim Herzmuskel ließ sich ein solcher Einfluß nicht nur der Herzglykoside, sondern auch der Corticoide nachweisen (56).

Für die Annahme, daß Steroide die Permeabilität der Zellmembran verändern, sprechen noch eine ganze Reihe weiterer Befunde.

So konnten F i s c h e r und W a g n e r bei ihren Lyseversuchen zeigen, daß das Zellgift Protamin in Gegenwart von Prednisolon in geringerem Maße in Erythrocyten eindringt als ohne Prednisolonzusatz (11). Zu gleichen Ergebnissen kamen S a n d r i t t e r , S ü s s e n b e r g e r , F i s c h e r und S c h i e m e r (50).

F i s c h e r , F r i t z s c h e und A r -

g e n t o n fanden, daß Prednisolon die Aufnahme von Inosin und Glucose in die Erythrocyten hemmt (13).

Auch Cr^{51} diffundiert in geringerem Maße in die Erythrocyten hinein, wenn man dem Blut Prednisolon zusetzt (13).

Desgleichen wird der Einbau von Phosphat in die Zelle unter Prednisoloneinfluß vermindert (14).

Nach L e s t e r , S t o n e und H e c h t e r verhindert Desoxycorticosteron (DOC) die Aufnahme von Sucrose, Glucose und Xylose, sowie von Lysin, Glycin, Phenylalanin und auch von Rubidium durch *Neurospora crassa* (25).

Alle diese Ergebnisse sprechen für eine "membranabdichtende" Wirkung der Steroide, und es wäre denkbar, daß durch eine Hemmung der Substrataufnahme oder eine Einwirkung auf die Grenzflächen der Zelle eine Verminderung ihrer Stoffwechselaktivität zustande kommt.

Für diese Annahme sprechen auch die Resultate der Arbeiten D o r f m a n s , H a y a n o s und S c h i l l e r s , die zeigten, daß verschiedene Steroide den O_2 -Verbrauch von Leber-, Gehirn und Nierenschnitten sowie von Gehirnhomogenaten reduzieren (20).

L e s t e r , S t o n e und H e c h t e r beobachteten unter dem Einfluß von DOC, aber auch verschiedener anderer Steroide eine Abnahme der Substrat-atmung bei *Neurospora crassa*, sowie eine Verminderung der Keimfähigkeit der Conidien (25).

T h o m a s und D i n g l e berichten, daß die aerobe und anaerobe Glucoseverwertung der Synovia unter dem Einfluß von Hydrocortison gehemmt und dementsprechend die Milchsäurebildung blockiert wird (58).

H ü b e n e r und C l o e r e n berichten, daß unter der Wirkung von Cortisol der O_2 -Verbrauch von Ascites-Tumor-Zellen in Gegenwart von Dinitrophenol erheblich absinkt, während Dinitrophenol allein den Sauerstoffverbrauch der Zellen steigert (22).

O' B r i e n und C o n w a y stellten fest, daß DOCA (Desoxycorticosteronacetat) die aktive Aufnahme von K^+ und die Ausscheidung von Na^+ durch Erythrocyten verringert (33); gleichartig ist, wie C o n w a y und H i n g e r t y fanden, die Wirkung von DOCA auf Hefezellen (5).

Nicht nur die Keimfähigkeit der Conidien von *Neurospora crassa* wird durch DOC verringert (25), auch die Keimfähigkeit höherer Pflanzen wird durch Steroide beeinflusst. Dies konnte Irmgard U l s a m e r im Labor der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt am Main in eindrucksvollen Versuchen beweisen. Sie ließ Bohnen einmal in normalem Leitungswasser keimen, zum andernmal setzte sie dem Wasser Cortison zu. Dabei bewirkte der Cortisonzusatz eine deutliche Verzögerung des Wachstums der Bohnenkeimlinge (59).

R ó k a konnte zeigen, daß in Blut, welches in einem geschlossenen System zirkuliert, zwar die für die Gerinnung typischen Vorgänge (Abnahme der Thrombocytenzahl, Prothrombin $\longrightarrow$ Thrombin usw.) ablaufen, daß das Blut aber nicht gerinnt. Außerdem kommt es zu einer deutlichen Hämolyse (46). Prednisolon vermag aber die Gerinnungsvorgänge bei diesem Versuch zu bremsen und bewirkt auch eine Verminderung der Hämolyse.

Die Verlangsamung der Stoffwechselprozesse einer unter Steroideinfluß stehenden Zelle dürfte zwar einerseits einen geringeren Verschleiß, andererseits aber auch eine Verringerung ihrer Leistungsfähigkeit zur Folge haben. Als Beispiel dafür mag die allgemein bekannte, entzündungshemmende Wirkung des Cortisons gelten. Hier verhindert das Steroid eben alle jene Reaktionen, die für die Mesenchymzelle charakteristisch sind. Die Mobilisierung der Histiocyten wird gehemmt und damit weniger Makrophagen freigesetzt (30). Die gebildeten Makrophagen weisen eine geringere Phagocytosefähigkeit auf (30); das Ausprossens der Fibroblasten und damit die Bildung eines

Granulationsgewebes wird erschwert; die Antikörperbildung wird gehemmt.

Für die Erythrocyten würde eine Stoffwechselhemmung bedeuten, daß der Energiebedarf der Zelle herabgesetzt wird und damit auch die Alterungsvorgänge der Zelle langsamer ablaufen. Dadurch fällt aber der Erythrocyt erst später als üblich den Mauserungsprozessen zum Opfer, mit anderen Worten, die Hämolyse alternder Erythrocyten wird gehemmt.

Tatsächlich ist, wie die vorhin besprochenen Versuche zeigen, unter der Wirkung einiger Steroide die Hämolyse alternder Erythrocyten gegenüber den unbehandelten Kontrollen herabgesetzt.

An dieser Stelle ist die Frage berechtigt, warum nur einige der verwandten Steroide einen Schutzeffekt erkennen lassen und andere nicht.

Diese Frage läßt sich mit S z e n t - G y ö r g y dadurch beantworten, daß die Angriffspunkte innerhalb der Zellmembran für die verschiedenen Steroide ebenfalls verschiedene sind (56). So hemmt zum Beispiel Cortison vorwiegend die Zellfunktionen, die für die Entzündungsvorgänge charakteristisch sind, während DOC vor allem einen Einfluß auf den Ionentransport ausübt. Prägnanter drückt dies S z e n t - G y ö r g y aus, der erklärt, daß die Affinität der einzelnen Steroide zu einzelnen Angriffspunkten innerhalb der Zellmembran eine verschiedene sei.

Nach U l s a m e r kann wegen dieser unterschiedlichen Affinität die Wirksamkeit einzelner Steroide so stark sein, daß die Zellfunktionen nicht nur gebremst werden, sondern völlig zum Erliegen kommen, und damit kehrt sich die Schutzwirkung in eine Schädigung um. U l s a m e r konnte dies in eindrucksvollen, vergleichenden Versuchen an Lymphocyten, Granulocyten und Leukämiezellen nachweisen (59).

Nach dem bisher Gesagten sollte man erwarten,

daß unter dem Einfluß von Steroiden das Energiereservoir der Erythrocyten, das heißt ihr Gehalt an ATP, nicht verändert wird. Wie die Versuche zeigen, kommt es in der Tat unter Steroidzusatz zu keiner Regeneration von ATP, eine Beobachtung, die bereits von F i s c h e r und Mitarbeitern gemacht wurde (14).

Wenn auch Solu-Decortin-H oder 11-epi-Hydrocortison allein keinen Einfluß auf die Regenerartion energiereichen Phosphats haben, so verbessern sie dennoch, wie aus dem beschriebenen Konservierungsversuch Nr.2 (Seite 29, 36 und 37) hervorgeht, die Wirkung des Inosins. Man kann sich diese Erscheinung so erklären, daß die Steroide zwar einerseits die Aufnahme des Inosins in den Erythrocyten verzögern, andererseits aber die Stoffwechselprozesse und damit den Energiebedarf der Zelle derart drosseln, daß insgesamt eine Anreicherung der energiereichen Phosphate resultiert.

Diese Möglichkeit widerspricht durchaus nicht den Resultaten des Konservierungsversuchs Nr.3 (Seite 30, 38 und 39), der zeigt, daß eine Kombination von Steroiden mit IAG dem alleinigen Zusatz von IAG nicht überlegen ist. Im Gegensatz zum Inosin scheint das Nucleosidgemisch IAG eine optimale Wirkung zu entfalten, sodaß selbst bei normalem, nicht gedrosseltem Stoffwechsel der Zelle ihr Energiebedarf vollständig gedeckt werden kann. Für diese Annahme spricht auch, daß ein späterer Zusatz von IAG zu gealterten Steroidkonserven den bereits aufgetretenen ATP-Verlust fast vollständig auszugleichen vermag (Siehe Konservierungsversuch Nr.4; Seite 31, 40 und 41).

Unerklärlich bleibt dagegen die Beobachtung, daß ein späterer Zusatz von IAG zu IAG-Konserven deren Fähigkeit ATP zu synthetisieren, eher verschlechtert, als verbessert.

E) Zusammenfassung:

In zahlreichen vorangegangenen Arbeiten wurde festgestellt, daß Adenosin oder Inosin die Überlebensfähigkeit alternder Erythrocyten steigert und daß eine Kombination zweier oder mehrerer Nucleoside die Wirkung der einzelnen Nucleoside noch übertrifft.

Außerdem ist bekannt, daß Cortison die Lyse geschädigter oder gealterter Erythrocyten zu verringern vermag, sodaß möglicherweise auch Steroide als konservierende Zusätze zu Blutkonserven hinzugefügt werden können.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, welches aus einer Gruppe von Steroiden die Hämolyse am stärksten hemmt und zu prüfen, ob eine Kombination von Steroiden mit einzelnen Nucleosiden oder einem Nucleosidgemisch die Lagerungsfähigkeit alternder Erythrocyten weiter verbessert.

Mit Hilfe von Messungen des Hämolysegrades gealterter Erythrocyten wurden zunächst Solu-Decortin-H und 11-epi-Hydrocortison als geeignete Zusätze ermittelt.

Danach wurde, - gemessen am ATP-Gehalt und am Hämolysegrad der Zellen, - untersucht, welche der Kombinationen

- a) Inosin
- b) Inosin + Adenin
- c) Inosin + Adenin + Guanosin (IAG)
- d) Inosin + Solu-Decortin-H oder 11-epi-Hydrocortison
- e) IAG + Solu-Decortin-H oder 11-epi-Hydrocortison

die Alterung der roten Blutkörperchen in vitro am ehesten zu verzögern vermag.

Es ließ sich übereinstimmend mit den Ergebnissen N a k a o s und F i s c h e r s zeigen, daß ein Nucleosidgemisch Inosin + Adenin + Guanosin (IAG) wirk-

samer ist, als ein Zusatz von Inosin oder Adenosin allein. Diese Ergebnisse lassen sich mit R u b i n - s t e i n et al. und N a k a o et al. dadurch erklären, daß durch den Zusatz von Adenin und Guanosen und durch deren Desaminierung NH_4 freigesetzt wird, welches das pH nach der basischen Seite verschiebt, und damit die Hexokinase-reaktion, die den limitierenden Faktor der Glykolyse darstellt, wieder in Gang gesetzt wird. Darüber hinaus liefern Adenin und, - wie B i s h o p fand, - auch Guanosen unmittelbar den Purinanteil der ATP und der GTP, während das Inosin über den Pentose-phosphatshunt ebenfalls zur Synthese energiereicher Phosphate beitragen kann.

Auch die von F i s c h e r beobachtete Hämolysehemmung durch Adenosin, Inosin und IAG konnte bestätigt werden.

Auf Grund der Untersuchungen von S z e n t - G y ö r g y , S e l y e , F l e c k e n s t e i n , L e s t e r et al. und F i s c h e r et al. darf man annehmen, daß Steroide die Permeabilität der Zellmembran verändern, damit die Stoffwechselprozesse und den Energiebedarf der Zelle drosseln und so ihre Alterung verzögern. Dabei haben Steroide keinen Einfluß auf die Synthese energiereicher Phosphate. Mit dieser Annahme stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit überein, denn es ließ sich zeigen, daß Solu-Decortin-H und 11-epi-Hydrocortison zwar die Hämolyse hemmen, dabei aber keinen Einfluß auf den ATP-Spiegel der Erythrocyten haben.

Kombiniert man Solu-Decortin-H oder 11-epi-Hydrocortison mit Inosin, so ergänzt sich offensichtlich die Wirkung des Nucleosids und die des Steroids, während das Nucleosidgemisch IAG bereits optimal wirksam ist, so daß ein weiterer Zusatz von Solu-Decortin-H oder 11-epi-Hydrocortison die zellkonservierende Wirkung des IAG nicht weiter zu steigern vermag.

F) Literaturverzeichnis:

1. Betke, K. und Savelsberg, W.
Biochem. Z. 320; 431, 1950
2. Bishop, C.
J. biol. Chem. 235; 3228, 1960
3. Blum, K.-U.
Bibl. haemat. vol. 12; 20, 1961
4. Chaplin, H., Crawford, H., Cutbush M., Mollison, P.L.
Clin. Sci. 15; 27, 1956
5. Conway, E.J., Hingerty, D.
Biochem. J. 55; 455, 1951
6. Dische, Z.
Symp. Phosph. Metabolism, Vol.I; pp 171-199
Johns Hopkins University Press, Baltimore 1951
7. Elmore, M.E.
J. Immunol. 15; 21, 1928, Zit. nach 12
8. Ferber, E., Göhring, I., Fischer, H.
Verhdlg. 8. Kongr. Europ. Ges. Haemat.
S. Karger, Basel 1962, Seite 479
9. Fleckenstein, A.
"Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzausschal-
tung." Steinkopff, Frankfurt am Main 1950
10. Fleckenstein, A. et al.
Schweiz. med. Wschr. 86; 1041, 1956 Zit. nach 51

11. Fischer, H., Wagner, L.
Naturwissensch. 22; 41, 532
12. Fischer, H., Fritzsche, W., Argenton, H.
Klin. Wschr. 36; 411, 1958
13. Fischer, H., Argenton, H., Fritzsche, W.
VII. Freiburg. Symp. über Hämolyse und hämolytische
Erkrankungen, Oktober 1959, Springer, Berlin.
Seite 65-83
14. Fischer, H., Herber, E., Fritzsche, W.,
Wosegien, F., Spielmann, W.
Bibl. haemat. vol. 12; 76, 1961
15. Fritzsche, W.
Verhdlg. 8. Kongr. Europ. Ges. Haemat.
S.arger, Basel 1962, Seite 474
16. Fritzsche, W.
Persönliche Mitteilung
17. Gabrio, B.W., Donohue, D.M., Finch, C.A.,
J. clin. Invest. 34; 1509, 1955
18. Gabrio, B.W., Hennesey, M., Thomasson, J., Finch, C.A.,
J. Biol. Chem. 215; 357, 1955
19. Gabrio, B.W., Finch, C.A., Huennekens, F.M.
Blood 11; 103, 1956
20. Hayano, M., Schiller, S., Dorfman, R.I.
Endocrinology 46; 387, 1950
21. Hock, A., Huber, G.
Hoppe Seylers Z. physiol. Chemie 308; 116, 1957

22. Huebener, H.J., Cloeren, St.
Z. physiol. Chemie 309; 1, 1957
23. Lachhein, L.
Klin. Wschr. 37; 832, 1959
24. Landsteiner, K.,
Wien. Klin. Wschr. Jahrg. 1901, Seite 1132
25. Lester, G., Stone, D., Hechter, O.
Arch. Biochem. Biophys. 75; 196, 1958
26. Linke, A., Schindera, S.
VII. Freiburg. Symp. über Hämolyse und hämolytische
Erkrankungen, Oktober 1959, Springer, Berlin.
Seite 86
27. Löhr, G.W., Waller, H.D.
Klin. Wschr. 36; 1008, 1958
28. Löhr, G.W., Waller, H.D.
Klin. Wschr. 37; 832, 1959
29. Lower, R.
Philosophical Trans. 1; 352, 1666 Zit. nach 54
30. Möschlin,
Acta haemat. 9; 227, 1953
31. Mollison, P.L., Sloviter, H.A.
Lancet 1951, II; Seite 862
32. Nakao, M., Nakao, T., Tatibana, M., Yoshikawa, H.,
Abe, T.
Biochim. biophys. Acta 32; 564, 1959

33. O' Brien, L., Conway, E.J.
Biochem. J. 64; 37P, 1956
34. Passow, H.
Bibl. haemat. vol. 12; 111, 1960
35. Pillemer, L.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 66; 233, 1956
36. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, J.H., Wurz, L.,
Todd, E.W.
J. exper. Med. 103; 1, 1956
37. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, J.H., Ross, O.A.,
Todd, E.W., Wardlaw, A.C.
Science 120; 279, 1954
38. Prankerdt, T.A.J., Altman, K.
Biochim. biophys. Acta 15; 158, 1954
39. Prankerdt, T.A.J., Altman, K.
Biochem. J. 58; 622, 1954
40. Prankerdt, T.A.J.
Biochem. J. 64; 209, 1956
41. Rapoport, S.
J. clin. Invest. 26; 591, 1947
42. Rapoport, S., Nieradt, C.
Biochem. Z. 326; 231, 1955
43. Robertson, M.
J. Bact. Path. 38; 362, 1934, Zit. nach 12

44. Robertson, O.H.
Brit. Med. J. Jahrg. 1918, Seite 691
45. Rous, P., Turner, T.J.
J. Exper. Med. 23; 219, 1916
46. Róka, L.
Bibl. haemat. vol. 12; 92, 1961
47. Rubinstein, D., Kashket, S., Denstedt, O.F.
Canad. J. Biochem. 35; 827, 1957
48. Rubinstein, D., Kashket, S., Denstedt, O.F.
Canad. J. Biochem. 36; 1269, 1958
49. Rubinstein, D., Kashket, S., Blostein, R.,
Denstedt, O.F.
Canad. J. Biochem. 37; 69, 1959
50. Sandritter, W., Fischer, H., Süssenberger, K.,
Schiemer, H.G.
Exp. Cell. Res. 17; 197, 1959
51. Schmitt, H.
Bibl. haemat. vol. 12; 94, 1961
52. Selye, H.
Endocrinology 30; 437, 1942
53. Sloviter, H.A.
Lancet 1951, I; Seite 823
54. Sloviter, H.A.
Klin. Wschr. 35; 425, 1957

55. Smith, A.V.
Lancet 1950, II; Seite 910
56. Szent-György, A.
The mechanism of inflammation.
Int. Symp. Montreal 1953, Seite 15
Acta Inc. 1953
57. Terbrüggen, A.
Beitr. path. Anat. 98; 264, 1936
58. Thomas, D.P.P., Dingle, J.T.
Biochem. J. 68; 231, 1958
59. Ulsamer, I.
Dissertation, Frankfurt am Main 1962
60. Wardlaw, A.C., Pillemer, L.
J. Exper. Med. 103; 533, 1956
61. Wosegien, F., Fischer, H.
Ber. ges. Physiol. 215; 9, 1960
62. "Biochemica Boehringer"
Enzymatische Bestimmung von Adenosin-5'-Triphosphor-
säure im Blut.

Lebenslauf.

Am 21. November 1933 wurde ich in Trautenau in Böhmen geboren. Meine Eltern sind der Uhrmacher Oskar Wik und seine Ehefrau Maria, eine geborene Marks.

Im Jahre 1938 übersiedelten wir nach Böhmischem Kamnitz, Kreis Tetschen-Bodenbach, wo ich auch vom September 1940 bis August 1944 die Volksschule und vom September 1944 bis April 1945 die Bürgerschule besuchte.

Nach unserer Vertreibung aus der nach dem Kriege wiedererstandenen Tschechoslowakei, kamen wir nach Holzhausen bei Homberg, Regierungsbezirk Kassel, und am 16. Oktober 1946 trat ich im benachbarten Homberg in das Realgymnasium ein, dessen Schüler ich bis zu meiner Reifeprüfung am 8. März 1955 blieb.

Im Sommersemester 1955 begann ich das Medizinstudium an der Philipps-Universität zu Marburg an der Lahn. Nach sechs Semestern vorklinischen Studiums in Marburg bestand ich dort am 10. März 1958 die ärztliche Vorprüfung.

Nachdem ich noch ein weiteres Semester in Marburg studiert hatte, wechselte ich zum Wintersemester 1958/59 die Universität und immatrikulierte an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität zu Frankfurt am Main.

Hier setzte ich den klinischen Teil meiner Studien fort und beendete das Studium mit der ärztlichen Prüfung, die ich am 5. Februar 1962 bestand.

Seit dem 1. April 1962 bin ich Medizinalassistent am Senckenbergischen Pathologischen Institut der Universität Frankfurt.

Ich möchte diese Arbeit nicht abschließen, ohne Herrn Prof. Dr. med. H. Fischer, dem Leiter der Laboratorien der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt, gedankt zu haben, daß er mir das Thema dieser Arbeit überließ und mir jederzeit mit wertvollen Ratschlägen und Anregungen zur Seite stand.

Auch Herrn Dr. med. W. Fritzsche möchte ich für die vielen guten Ratschläge, die er mir gab, herzlich danken.

Dank gebührt auch dem Leiter der Blutbank Frankfurt, Herrn Prof. Dr. med. W. Spielmann, der mir großzügigerweise das für die Versuche benötigte Blut zur Verfügung stellte.

Nicht zuletzt und nicht minder herzlich ein "Dankeschön" der technischen Assistentin, Fräulein Karin Jakobiak, ohne deren Hilfe die Durchführung der Versuche wesentlich länger gedauert hätte sowie Herrn cand. phil. Hermann Ingebrand, der mir bei der Korrektur der Arbeit geholfen hat.

Meine akademischen Lehrer waren:

Anatomie:

Prof. Dr. Niessing, Marburg

Physiologische Chemie:

Prof. Dr. Bücher, Marburg

Physiologie:

Prof. Dr. Hensel, Marburg

Chemie:

Prof. Dr. Dimroth, Marburg

Physik:

Prof. Dr. Walcher, Marburg

Zoologie:

Prof. Dr. Seidel, Marburg

Botanik:

Prof. Dr. Pirson, Marburg

Pathologie:

Prof. Dr. Linzbach, Marburg

Prof. Dr. Lauche, Frankfurt

Hygiene:

Prof. Dr. Herzberg, Frankfurt

Pharmakologie:

Prof. Dr. Holtz, Frankfurt

Forensische Medizin:

Prof. Dr. Wiethold, Frankfurt

Chirurgie:

Prof. Dr. Zenker, Marburg
Prof. Dr. Geißendörfer, Frankfurt

Innere Medizin:

Prof. Dr. Bock, Marburg
Prof. Dr. Hoff, Frankfurt
Prof. Dr. Gänsslen, Frankfurt

Gynäkologie:

Prof. Dr. Huber, Marburg
Prof. Dr. Schwenzer, Frankfurt

Pädiatrie:

Prof. Dr. de Rudder, Frankfurt

Oto- Rhino- Laryngologie:

Prof. Dr. Mittermaier, Frankfurt

Ophthalmologie:

Prof. Dr. Thiel, Frankfurt

Dermatologie:

Priv. Doz. Dr. Landes, Frankfurt

Neurologie und Psychiatrie:

Prof. Dr. Zutt, Frankfurt

Orthopädie:

Prof. Dr. Güntz, Frankfurt

Odontologie:

Prof. Dr. v. Reckow, Frankfurt

Ehrenwörtliche Erklärung.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Nucleosiden, Steroiden und Nucleosid-Steroid-Gemischen auf alternde Erythrocyten" in der I. Medizinischen Universitätsklinik zu Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. med. Herbert Fischer und mit Unterstützung durch die technische Assistentin, Fräulein Karin Jakobiak, (Hilfe bei der Durchführung der Versuche) doch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in keinem Publikationsorgan veröffentlicht.

Frankfurt am Main, den 18. März 1963

Kurt Wisk

